

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INPI
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

PCT/FR 99 / 02 329

REC'D 11 OCT 1999

WIPO PCT

FR 99 / 2323

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

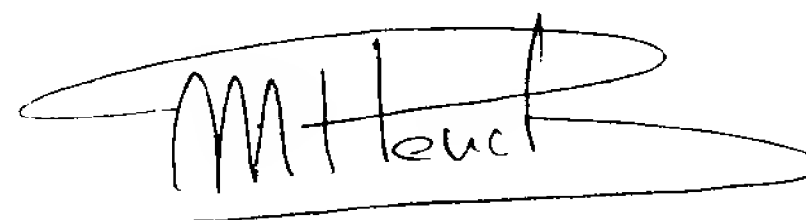
99/787923

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 26 AOUT 1999

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets



Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Telephone 01 53 04 53 04
Telecopie 01 42 93 59 30





28 bis, rue de Saint Petersburg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

cerj
N° 55-132

DATE DE REMISE DES PIÈCES

02 OCT. 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 12366 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

02 OCT. 1998

1

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

BREVATOME
25 rue de Ponthieu
75008 PARIS
422-5/S002

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ diffère

☐ immédiat

☐ oui

☐ non

Établissement du rapport de recherche

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

STRUCTURE CHIMIQUE AYANT UNE AFFINITÉ POUR UN PHOSPHOLIPIDE, ET
COMPOSE DE MARQUAGE, TROUSSE DE DIAGNOSTIC, ET MÉDICAMENT COMPRENANT
CETTE STRUCTURE.

code APE-NAF

Forme juridique

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
Etablissement de Caractère Scientifique,
Technique et Industriel

UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE (Paris VI)

Nationalité (s)

Française

Pays

France

Adresse (s) complète (s)

31, 33 rue de la Fédération 75015 PARIS

4, Place Jussieu Tour Centrale
75252 PARIS CEDEX 05

France

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

M. DES TERMES
422-5/S002

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

DEPARTEMENT DES BREVETS

B 13117.3/EE

98/12366

TITRE DE L'INVENTION :

STRUCTURE CHIMIQUE AYANT UNE AFFINITE POUR UN PHOSPHOLIPIDE,
ET COMPOSE DE MARQUAGE, TROUSSE DE DIAGNOSTIC, ET MEDICAMENT
COMPRENANT CETTE STRUCTURE.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

M. DES TERMES
c/o BREVATOME
25 rue de Ponthieu
75008 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)

Alain SANSON

2 Avenue de la Villeneuve
91940 GOMETZ LE CHATEL

Françoise RUSSO-MARIE

105 rue de Bruyères
92310 SEVRES

Jean-Michel NEUMANN

Bât.2 Les Quinconces
91190 GIF SUR YVETTE

Françoise CORDIER-UCHSENBEIN

12 rue des Patriaches
75005 PARIS

Raphael GUEROIS

12 rue des Patriaches
75005 PARIS

FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire
PARIS LE 2 Octobre 1998

M. Des Termes
M. DES TERMES
422-5/S002

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
51			4	08.01.99.	19 JAN. 1999 - SR

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R 612-36
du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées)

STRUCTURE CHIMIQUE AYANT UNE AFFINITE POUR UN
PHOSPHOLIPIDE, ET COMPOSE DE
MARQUAGE, TROUSSE DE DIAGNOSTIC, ET MEDICAMENT
COMPRENANT CETTE STRUCTURE

5

DESCRIPTION

Domaine technique

La présente invention se rapporte à une structure
10 chimique ayant une affinité pour un phospholipide ainsi
qu'à une molécule de détection, à un conjugué et à une
composition pharmaceutique comprenant ladite structure.

De manière générale, la structure chimique de la
présente invention est utile pour la reconnaissance
15 spécifique de vecteurs lipidiques. Elle est utilisable
pour l'ingénierie et la création de composés de
reconnaissance et de séquestration de lipides notamment
de lipides chargés négativement, tels que la
phosphatidylsérine et/ou l'acide phosphatidique.

20 Ces lipides jouent un rôle important notamment
dans la signalisation cellulaire et peuvent être
présents à la surface externe des membranes des
cellules et/ou circuler dans le milieu sanguin à la
suite d'événements pathologiques très divers.

25 Divers événements cellulaires aboutissent à
l'apparition de phosphatidylsérine (PS) à la surface
externe des cellules, ces événements peuvent résulter
soit d'une altération fortuite ou pathologique de la
cellule, soit d'un événement cellulaire programmé telle
30 que la mort cellulaire ou apoptose. L'apparition de PS
à la surface externe des cellules constitue donc un
"message primaire" important témoignant de l'existence
d'un dysfonctionnement. Dans le cas du processus de
coagulation sanguine, le mécanisme est bien décrit :

l'altération des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, soit pour des raisons accidentelles, soit pour des raisons pathologiques plus complexes, provoque l'apparition de ce message PS à la surface externe des
5 cellules en contact avec le milieu sanguin. Ce message est immédiatement reconnu par certaines protéines circulantes qui déclenchent alors une cascade d'événements aboutissant au phénomène de coagulation sanguine bien connu.

10 L'invention tire profit de la propriété de la structure qu'elle fournit de se lier, en présence ou non de calcium, aux lipides et notamment ceux chargés négativement, pour la mise en point de composés utilisables comme outils de recherche, de diagnostic et
15 de thérapeutique dans le domaine de la reconnaissance des effecteurs lipidiques en général et de la détection de l'apoptose, des troubles de la coagulation sanguine, du choc septique et des pathologies inflammatoires aiguës en particulier.

20 Concernant la recherche et le diagnostic, la structure de l'invention peut par exemple être couplée à des molécules de détection, par exemple à une molécule fluorescente, au complexe avidine-biotine, à un radioélément à vie courte, ou à un composé
25 paramagnétique. Avec ces molécules de détection, il est possible par exemple de détecter des cellules apoptotiques ou de reconnaître des microdomaines membranaires chargés négativement.

La structure de la présente invention peut donc
30 être utilisée pour une détection "in vitro" de pathologies impliquant l'apparition de charges négatives à la surface des cellules et la libération dans le sang de microvésicules.

La structure de la présente invention peut également être utilisée lorsqu'elle est couplée par exemple à un radioélément à vie courte, pour une détection "in vivo" de zones thrombotiques lors
5 d'accidents vasculaires de toute sorte, en particulier cérébraux, en utilisant des systèmes d'imagerie. Cette structure peut par ailleurs être utilisée lorsqu'elle est couplée à un composé paramagnétique tel qu'un complexe gadolinium pour une détection "in vivo" de
10 zones thrombotiques, en particulier cérébrales, en utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Concernant la thérapeutique, de manière générale, la structure de la présente invention peut être utilisée seule ou couplée à une molécule thérapeutique
15 pour préparer un médicament utilisable par exemple par voie orale. Un tel médicament peut par exemple être utilisé pour le ciblage de cette molécule vers des zones présentant des charges négatives telles que des tumeurs présentant des foyers de cellules apoptotiques
20 ou des tumeurs inflammatoires.

La structure de la présente invention peut par exemple être couplée à des molécules à action thrombolytique pour préparer un médicament qui peut être utilisé par exemple par voie orale en tant
25 qu'anti-coagulant dans le traitement et la prophylaxie de la thrombose, ou pour préparer une molécule recouvrant tous les biomatériaux thrombogènes. La structure de la présente invention peut donc être utilisée pour le ciblage des molécules thrombolytiques
30 au site du thrombus ou vers les zones thrombogènes.

Dans un autre exemple d'application de la présente invention, la structure de l'invention peut être seule ou couplée à une molécule anti-inflammatoire pour

préparer un médicament qui peut être utilisé par voie orale, par exemple dans des pathologies aiguës comme l'asthme, la rectocolite hémorragique (RCH), le Crohn, le choc septique, les maladie du collagène et de l'arthrite.

Etat de la technique

Une famille de protéines, appelées annexines, ont été décrites dans l'art antérieur comme présentant un ancrage fonctionnel réversible à la membrane cellulaire, régulé par la concentration en calcium et la présence de phospholipides anioniques. Les annexines constituent une famille de protéines exprimées dans des tissus très divers, aussi bien chez les animaux que chez les plantes. Il semble qu'elles ne sont ni exprimées chez la bactérie, ni chez la levure.

La structure des annexines comporte quatre domaines d'environ 70 acides aminés, ou résidus, très moyennement homologues en séquence mais de topologie quasiment identique.

La figure 1A en annexe est un schéma de la topologie générale d'une annexine et la figure 1B en annexe est un schéma de la topologie d'un domaine de l'annexine portant un site calcium. Sur la figure 1A, C représente l'extrémité C-terminale de cette protéine, N représente l'extrémité N-terminale de cette protéine. Les domaines, notés D1 à D4, sont associés en deux modules, l'un covalent D2D3, l'autre non covalent D1D4. Sur la figure 1B, A représente une première hélice α , B représente une deuxième hélice α , C représente une troisième hélice α , D représente une quatrième hélice α , E représente une cinquième hélice α , et Ca représente l'atome de calcium. L'association de ces

hélices constitue la structure consensus pour un domaine d'annexine.

A l'heure actuelle, leurs rôles biologiques demeurent encore mal définis.

5 Dans le document WO 92/19279, J. TAIT décrit des conjugués ayant une affinité pour des phospholipides. Il décrit en particulier l'utilisation de l'annexine, en particulier de l'annexine V, pour fabriquer un conjugué actif utilisable en tant qu'agent
10 thrombolytique.

Malheureusement, le conjugué décrit dans ce document est préparé à partir de l'annexine entière par un procédé de recombinaison génétique. De ce fait, il apparaît de nombreux inconvénients qui sont notamment
15 un rendement faible, un coût de fabrication élevé, et l'obtention d'un conjugué fragile du fait de sa partie protéique complexe.

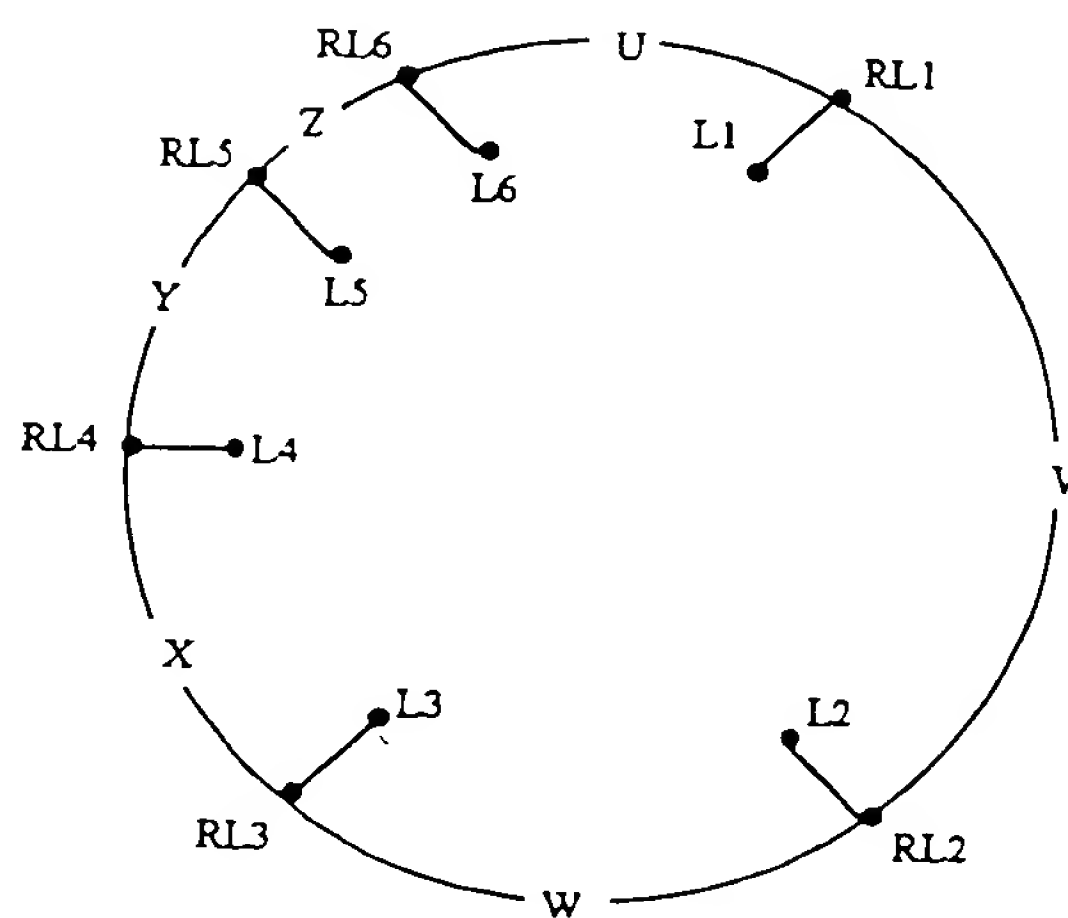
Exposé de l'invention

20 La présente invention a précisément pour but de fournir une structure chimique ayant une affinité spécifique avec un phospholipide. La structure chimique de l'invention présente notamment l'avantage d'être stable chimiquement et de pouvoir être fabriquée de
25 manière reproductible, avec un rendement élevé et un coût de fabrication très réduit par rapport aux composés de l'art antérieur.

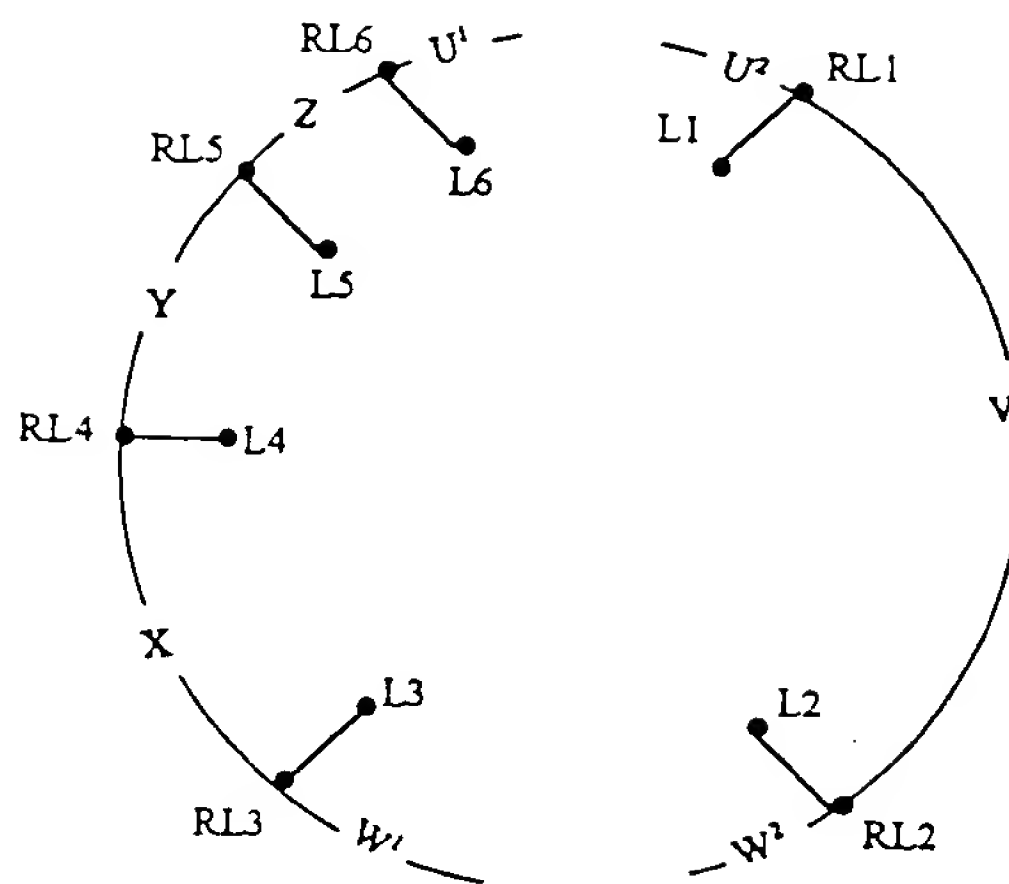
La structure de la présente invention se caractérise en ce qu'elle comprend au moins une plate-
30 forme chimique U, V, W, X, Y comportant six résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, ces

fonctions chimiques définissant au moins en partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (I), (II) et (III) suivantes :

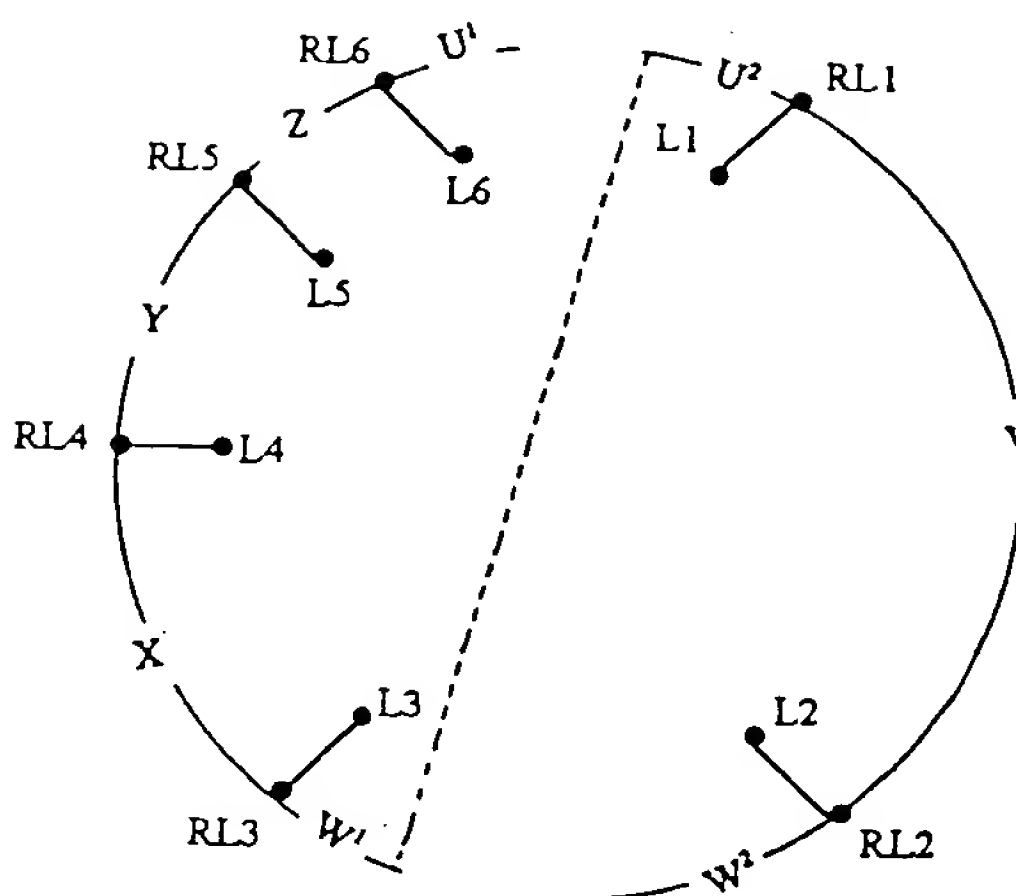
5



(I)



(II)



(III)

5

dans lesquelles U , U^1 , U^2 , V , W , W^1 , W^2 , X , Y , Z sont indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel, un peptide constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s) cyclique(s) carboné(s),

10

dans lesquelles RL1 à RL6 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement, lesdites fonctions chimiques comprenant soit au moins une charge positive et
5 donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, et dans lesquelles U, U¹, U², V, W, X, Y et Z sont tels que RL6 et RL1 sont distants de 0,65 à 0,95 nm, L6 et L1 sont distants de 0,65 à 0,9 nm, RL1 et RL2 sont
10 distants de 0,45 à 0,65 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de
15 0,45 à 0,75 nm et L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II) ou (III), L1, L2, L3 et L6
20 peuvent présenter chacune au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4 et L5 peuvent présenter chacune au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

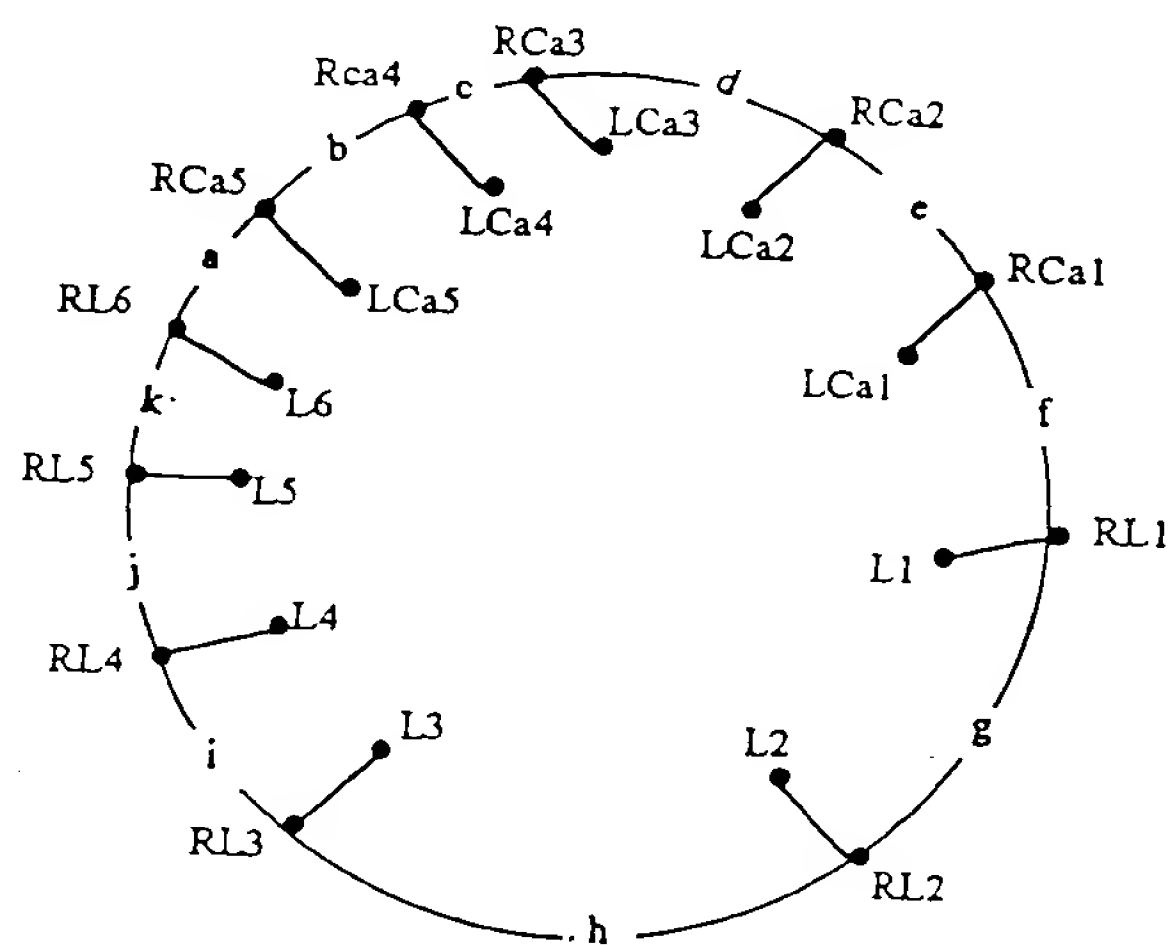
Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II) ou (III), U, V, W, X, Y et Z
25 peuvent être des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 étant les fonctions chargées des chaînes
30 latérales desdits acides aminés.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II) ou (III), RL1 à RL6 peuvent être

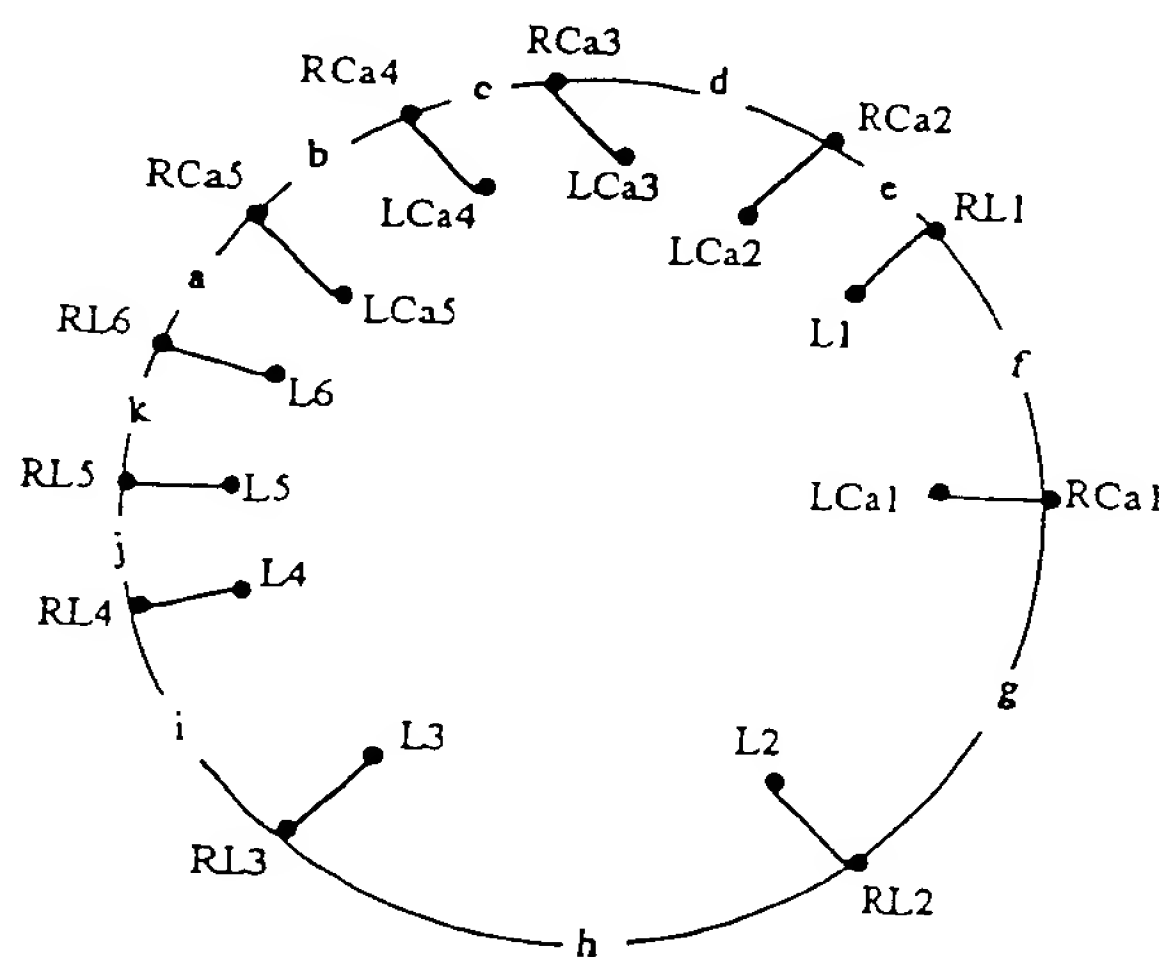
disposés dans l'espace formé par U, V, W, X, Y, Z de manière à ce que les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement de leur chaîne latérales soient directement accessibles au phospholipide.

5 Selon l'invention, la structure de construction (I), (II) ou (III) peuvent comprendre en outre un site calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide.

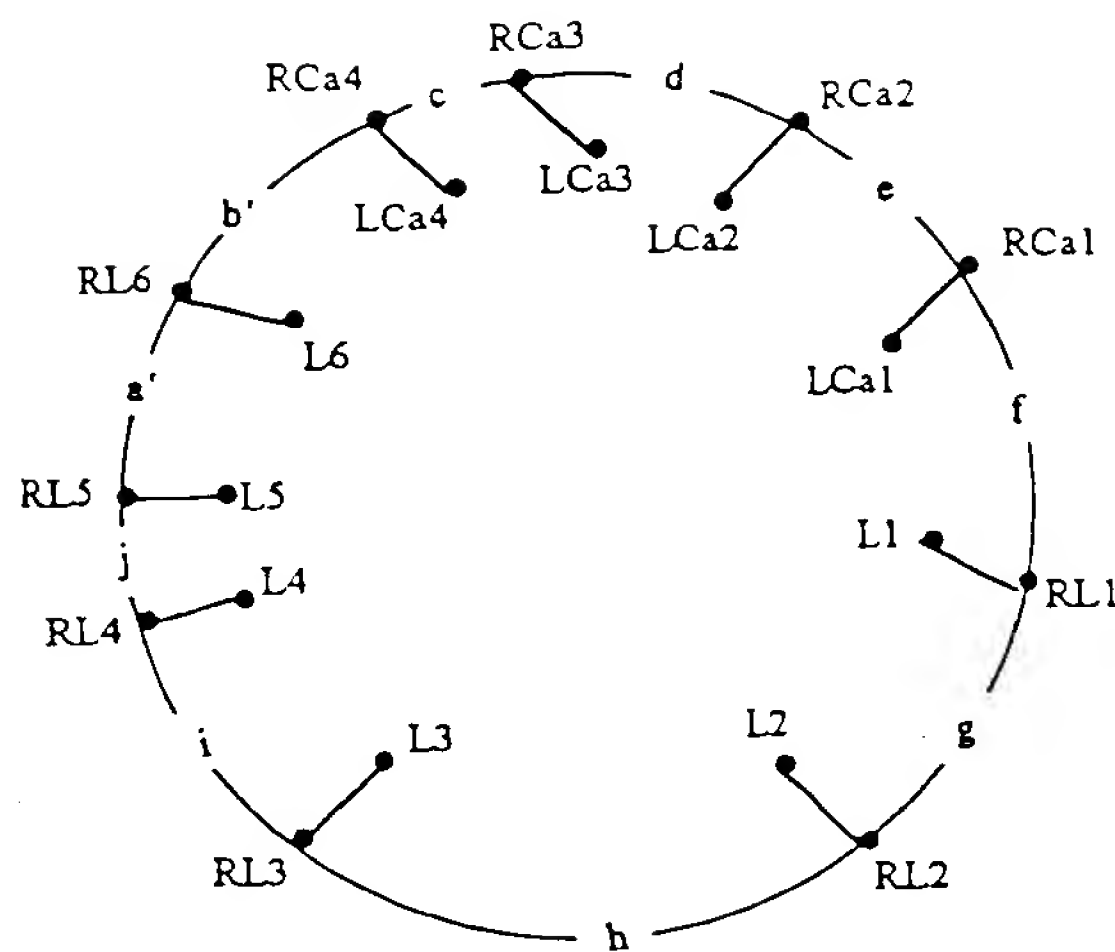
10 La présente invention fournit également une structure chimique qui est caractérisé en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l comportant 11 résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6, RCa1, RCa2, RCa3, RCa4 et RCa5 supportant un ensemble de fonctions chimiques
15 pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, et un ensemble de fonctions chimiques de liaison à un atome de calcium appelées LCa1, LCa2, LCa3, LCa4, LCa5 respectivement, ces fonctions chimiques RL1 à RCa5 définissant au moins
20 en partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (IV), (V) et (VI) suivantes :



(IV)



(V)



(VI)

dans lesquelles a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l sont indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel, un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s) cyclique(s) carboné(s),
 dans lequel RL1 à RL6 et RCa1 à RCa5 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de
 10 liaison L1 à L6 et LCa1 à LCa5 respectivement, lesdites fonctions chimiques L1 à L6 comprenant soit au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, lesdites fonctions chimiques LCa1 à
 15 LCa5 comprenant un atome d'oxygène, et
 dans lesquelles a dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RL6 et RCa5 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa5 sont distants de 0 à 0,3 nm, b dans les structures de construction (IV) et
 20 (V) est tel que RCa5 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que LCa5 et LCa4 sont distants de 0,2 à 0,3 nm, b' dans la structure de construction (VI) est

tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, c et d sont tels que RCa4 et RCa3 sont distants de 0,5 à 0,9 nm, LCa4 et LCa3 sont distants de 0,2 à 0,4 nm, 5 RCa3 et RCa2 sont distants de 0,35 à 0,6 nm, et LCa3 et LCa2 sont distants de 0,22 à 0,3 nm, e, f, g, dans les structures de construction (IV), (V), (VI) sont tels que RL1 et RL2 sont distants de 0,45 à 0,65 nm, RCa1 à RCa2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, L1 et L2 sont 10 distants de 0,4 à 0,55 nm et LCa1 et LCa2 sont distants de 0,3 à 0,4 nm, h, i, j et k sont tels que RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et 15 RL5 sont distants de 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, a' dans la structure de construction (VI) est tel que RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm et tel 20 que L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, et b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, la structure pouvant être soit fermée, soit ouverte au niveau de a et/ou de h.

25 Les plates-formes selon l'invention sont constituées d'un ensemble de groupes chimiques structuraux pouvant comprendre un nombre de groupes cycliques suffisants pour assurer une rigidité compatible avec l'affinité au phospholipide.

30 Les distances mesurées lorsque les RL et les RCa sont des acides aminés, peuvent être mesurées entre les carbones α de ces acides aminés dans les structures (I) à (VI) précitées.

Ces structures peuvent être synthétisées par les procédés classiques de synthèse de la chimie organique et de la chimie des protéines, par recombinaison génétique, par génie génétique, etc...

5 Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), L1, L2, L3 et L6 peuvent présenter chacune au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4, L5, LCa5, LCa4, LCa3, LCa2 et LCa1 peuvent présenter chacune au
10 moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

 Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), RL1, RL2, RL3 et RL6 peuvent être choisis indépendamment
15 parmi Arg, Lys, Orn ; RL4 peut être choisi indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 peut être choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, les chaînes latérales de ces acides aminés présentant les fonctions chimiques de liaison au phospholipides L1 à
20 L6 respectivement.

 Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), a ou a', b ou b', c, d, e, f, g, h, i, j, k peuvent être des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et
25 RL1 à RL6 peuvent être des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 et LCa1 à LCa5 peuvent être les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés, et RCa1 à RCa5 peuvent
30 être des acides aminés naturels ou non naturels.

 Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), les carbones RL1 à RL6 et RCa1 à RCa2 peuvent être disposés dans l'espace

formé par a, b, c, d, e, f, g, h, i, j et k de manière à ce que les fonctions chimiques de liaisons L1 à L6 respectivement et les charges positives du calcium lorsque ce dernier est lié aux fonctions de liaison
5 LCa1 à LCa5 soient directement accessibles au phospholipide.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), au moins une partie de la plate-forme peut être une partie
10 d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, comprenant au moins un desdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement de liaison au phospholipide.

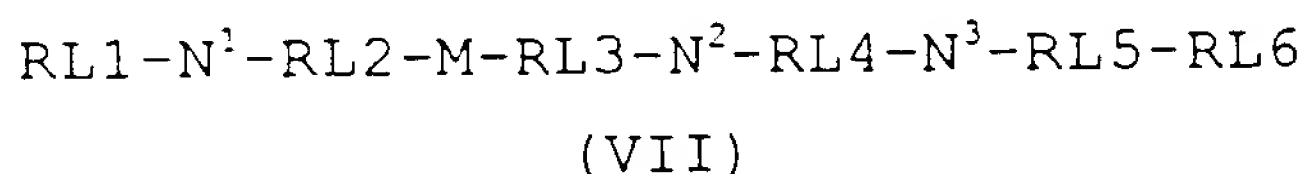
Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), la
15 plate-forme peut être une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, ladite partie du domaine de l'annexine comprenant lesdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites
20 fonctions L1 à L6 respectivement.

Selon l'invention, le domaine de l'annexine est choisi parmi le domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, le domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, le domaine 2 de l'annexine III présenté
25 sur la figure 6c et le domaine 1 et 2 de l'annexine IV présentés sur la figure 6d.

Selon l'invention, les résidus ligands RL1 à RL6 peuvent être respectivement soit, les résidus Arg25, Lys29, Arg63, Asp68, Ser71 et Glu 72 du domaine 1 de
30 l'annexine V présenté sur la figure 6b, soit les résidus Arg124, Lys128, Arg162, Asp167, Ser170 et Asp171 du domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, soit les résidus Lys100, Lys104, Lys138,

Asp143, Ser146 et Glu147 du domaine 2 de l'annexine III
 présenté sur la figure 6c, soit les résidus Arg97,
 Lys101, Arg135, Asp140, Ser143 et Asp144 du domaine 2
 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d, soit les
 5 résidus Arg24, Lys28, Arg62, Asp67, Ser70 et Glu71 du
 domaine 1 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d.

La présente invention fournit également une
 structure chimique ayant une affinité pour un
 phospholipide caractérisée en ce qu'elle comprend une
 10 molécule de formule (VII) suivante :



15 dans laquelle N^1 à N^3 représentent chacun indépendamment
 de 1 à 4 des acides aminés choisis indépendamment,
 naturels ou non naturels, et dans laquelle M est un
 peptide constitué de 1 à 100 acides aminés naturels ou
 non naturels ;

20 dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis
 indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn ; RL4 est choisi
 indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 est choisi
 indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, ladite
 structure étant linéaire ou cyclique.

25 Selon l'invention, N^1 peut représenter trois
 acides aminés, N^2 peut représenter quatre acides
 aminés, et N^3 peut représenter deux acides aminés dans
 la structure de formule VII.

Dans la structure selon l'invention, M peut être
 30 par exemple un peptide constitué de 33 acides aminés
 naturels ou non naturels.

Selon l'invention, la structure de formule (VII)
 peut être une séquence peptidique choisie parmi la

séquence peptidique allant de Arg124 à Ser171 dans la
 séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence
 peptidique allant de Arg25 à Glu72 dans la séquence ID
 n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence peptidique
 5 allant de Lys100 à Glu147 dans la séquence ID n°3
 présentée sur la figure 6c, la séquence allant de Arg24
 à Glu71 dans la séquence ID n°4 présentée sur la figure
 6d, la séquence allant de Arg97 à Asp144 dans la
 séquence ID n°5 présentée sur la figure 6d, ou une
 10 séquence modifiée de ces séquences pourvu que RL1, RL2,
 RL3 et RL6 soient choisis indépendamment parmi Lys, Arg
 ou Orn ;

RL4 choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et RL5 est
 choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu.

15 La présente invention fournit également une
 structure chimique ayant une affinité pour un
 phospholipide, comprenant au moins une partie d'une
 séquence peptidique choisie parmi la séquence ID n°1
 présentée sur la figure 6a, la séquence ID n°2
 20 présentée sur la figure 6b, la séquence ID n°3
 présentée sur la figure 6c, et les séquences ID n°4 et
 ID n°5 présentées sur la figure 6d, ou une séquence
 modifiée de celle-ci.

La présente invention fournit également une
 25 structure chimique ayant une affinité pour un
 phospholipide chargé négativement, comprenant une
 séquence peptidique cyclique de formule (VIII)
 suivante :

30 $\overline{\text{Gly-RL1-Phe-RL2-P}^1\text{-Gly-Tyr-P}^2\text{-RL3-P}^3\text{-RL4-Q}^1\text{-RL5-Trp-RL6}}$
 (VIII)

dans laquelle RL1 et RL6 sont choisis indépendamment
parmi Lys, Orn et Arg ; RL2 et RL3 sont Arg ; RL4 et
RL5 sont choisis indépendamment parmi Asp et Glu ;
dans laquelle P¹, P² et P³ sont choisis indépendamment
5 parmi Ser et Thr ; dans laquelle Q¹ est choisi parmi
Gly et Met.

Les structures chimiques précitées peuvent
comprendre en outre un site calcium où l'ion calcium
complexé par ce site constitue un des ligands du
10 phospholipide chargé négativement. Le site calcium peut
être par exemple un site calcium analogue à celui des
annexines ou des phospholipides A2. Ces sites calcium
sont connus par l'homme du métier.

Selon l'invention, toutes les structures chimiques
15 précitées peuvent avoir une affinité pour un
phospholipide choisi parmi une phosphatidylsérine, une
phosphatidyléthanolamine, une phosphatidylinositol, un
acide phosphatidique, et un cardiolipide, la ou les
chaîne(s) lipidique(s) des phospholipides peuvent par
20 exemple comprendre de 4 à 23 atomes de carbone. Par
exemple, le phospholipide peut posséder une chaîne
d'acide arachidonique, par exemple pour la
phosphatidylsérine.

La présente invention fournit également un
25 assemblage chimique ayant une affinité pour un
phospholipide, comprenant au moins deux des structures
chimiques de la présente invention, identiques ou
différentes, lesdites structures étant liées.

Par exemple, dans un assemblage chimique de la
30 présente invention, au moins une des structures
chimiques peut être une des structures chimiques
peptidiques précédemment décrites.

Les assemblages selon l'invention peuvent donc être composés par exemple de structures identiques ou différentes. Par exemple, l'assemblage peut être un assemblage covalent convenable de deux structures selon
5 l'invention, par exemple des domaines 1 et 4 selon l'invention d'une même annexine. Cet assemblage peut par exemple comporter un domaine 4 selon l'invention modifié par génie génétique dans le but d'introduire un site calcium et phospholipidique identique à celui du
10 domaine 1 de l'invention.

Ces domaines peuvent par exemple provenir des annexines I et V.

Ces assemblages peuvent avoir notamment pour but d'augmenter l'affinité des structures de la présente
15 invention, pour le phospholipide, par exemple pour un phospholipide chargé négativement. Ils peuvent être réalisés par exemple par insertion d'un lien peptidique flexible, par exemple poly-glycine, entre les structures chimiques de l'invention.

20 Les structures et assemblages de la présente invention présentent une affinité pour les phospholipides, et notamment pour ceux chargés négativement, meilleure que 0,1 μ M. Ils peuvent comprendre une partie d'une annexine ou l'un de ses
25 dérivés. Cette annexine peut être une annexine naturelle ou modifiée par les moyens classiques de la chimie ou du génie génétique.

La présente invention fournit également un procédé de fabrication d'une structure chimique comprenant les
30 étapes de préparation d'un cDNA comprenant une séquence de base codant pour ladite structure chimique, d'insertion du cDNA dans un vecteur d'expression approprié, de transformation d'une cellule hôte

appropriée pour une répllication du plasmide et la fabrication de ladite structure par traduction dudit cDNA.

Selon l'invention, dans ce procédé, le vecteur
5 peut être un plasmide, par exemple le vecteur pGEX-2T.

Dans le procédé selon l'invention, la cellule hôte appropriée peut être par exemple *E. Coli*.

Par exemple, pour la fabrication de la structure selon l'invention, on peut partir du domaine 1 de
10 l'annexine I et modifier la séquence de telle manière que les résidus RL définis précédemment et éventuellement les résidus RCa apparaissent dans la séquence. Ainsi, par des procédés classiques de génie génétique, on peut fabriquer un cDNA codant pour la
15 séquence modifiée et obtenir très facilement la structure de la présente invention. La structure selon l'invention, lorsqu'elle présente au moins une partie peptidique peut également être fabriquée par un procédé classique de synthèse chimique en phase solide.

20 Un exemple de modification de la séquence du domaine 1 de l'invention de l'annexine I peut consister à remplacer His52 par Arg, Met56 par Lys ou Arg, Val57 par Gly, Val60 par Tre, éventuellement Lys90 par Arg, Thr95 par Asp, Lys98 par Ser ou Thr, et Ala99 par Asp
25 ou Glu. Ces modifications peuvent être faites sur d'autres domaines également.

Ces modifications peuvent avoir notamment pour rôle d'augmenter la stabilité générale de la structure ou du domaine vis-à-vis de la température, du pH, et
30 des conditions ioniques du milieu d'utilisation ; de diminuer ses propriétés éventuelles de toxicité générale envers l'organisme humain ; d'augmenter son affinité pour les phospholipides chargés négativement ;

et d'augmenter son affinité générale pour les membranes cellulaires.

Selon l'invention, la modification d'un domaine peut également avoir pour rôle de développer l'affinité
5 de la structure pour un phospholipide, par exemple chargé négativement ; et même de retrouver une affinité au moins égale à celle que possède l'annexine dite sauvage, en l'absence de calcium.

La modification peut par exemple porter sur le
10 résidu dit résidu bidentate Asp ou Glu de calcium (RL6) du ou des domaines portant un site phosphatidylsérine, pour les remplacer par l'un des résidus Lys ou Orn.

Une autre modification, par exemple du domaine 1 de l'annexine V peut consister à remplacer Glu 72 par
15 Lys ou Orn, et/ou Thr 33 par Lys ou Orn.

Selon l'invention, la structure chimique ou l'assemblage de la présente invention peut être utilisée pour préparer un médicament.

Par exemple, le médicament peut être choisi parmi
20 un médicament destiné au traitement d'une thrombose, un médicament destiné au traitement d'une tumeur, un médicament ayant une action anti-inflammatoire.

Selon l'invention, la structure ou l'assemblage chimique selon l'invention peut être couplé à une
25 molécule de marquage pour former un composé de marquage.

Selon l'invention, la molécule de marquage peut être choisie par exemple parmi une molécule fluorescente, le complexe avidine-biotine, un
30 radioélément, et un composé paramagnétique.

La présente invention fournit aussi une trousse de diagnostic comprenant une structure ou un assemblage précité.

Cette trousse de diagnostic peut par exemple comprendre en outre un réactif adéquat permettant de détecter ladite molécule de marquage.

La présente invention fournit également une
5 trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure ou un assemblage chimique de la présente invention.

La présente invention fournit également une
10 trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure ou un assemblage chimique de la présente invention couplé à un marqueur.

15

D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront encore à la lecture des exemples illustratifs et non limitatifs qui suivent, en référence aux figures en annexe.

20

Brève description des figures

- la figure 1A est une représentation schématique de la structure générale des annexines ;
- la figure 1B est une représentation schématique de la structure d'un domaine d'une annexine
25 comportant un site calcium ;
- la figure 2 est un schéma illustrant l'insertion dans un vecteur PGEX-2T du cDNA codant pour la structure chimique de la
30 présente invention pour produire ledit composé par génie génétique ;
- la figure 3 est une représentation schématique d'un spectre RMN ^1H du domaine 1 de la présente

invention de l'annexine I présentant la région des aliphatiques ;

5 - la figure 4 est une représentation graphique de la dénaturation du domaine 1 de la présente invention de l'annexine I par le chlorure de guanidinium ;

- la figure 5 est une représentation graphique de la dénaturation thermique du domaine 1 de la présente invention de l'annexine I ;

10 - la figure 6a représente la séquence de l'annexine I, notée séquence ID n°1, dans laquelle la séquence du domaine 2 de la présente invention a été soulignée ;

15 - la figure 6b représente la séquence de l'annexine V, notée séquence ID n°2, dans laquelle la séquence du domaine 1 de la présente invention a été soulignée ;

20 - la figure 6c représente la séquence de l'annexine III, notée séquence ID n°3, dans laquelle la séquence du domaine 2 de la présente invention a été soulignée ;

25 - la figure 6d représente la séquence de l'annexine IV, notée séquence ID n°4 et séquence ID n°5, dans laquelle la séquence des domaines 1 et 2 de la présente invention ont été soulignées ;

30 - la figure 7 est une représentation schématique de la structure de construction (I) de la présente invention liée à une molécule de phosphatidylsérine mettant en évidence les interactions entre les fonctions de liaison L1 à L6 de la structure de construction (I) de

l'invention et une molécule de phosphatidylsérine ;

- 5 - la figure 8 est une représentation schématique des interactions entre les résidus ligands du domaine 1 de la présente invention de l'annexine V humaine représenté sur la figure 6b, et une molécule de phosphatidylsérine en présence d'un atome de calcium.

10

EXEMPLES

Exemple 1 : Expression et purification des peptides de séquences ID n°1 et ID n°2 de la présente invention

15 Les séquences ID n°1 et ID n°2 des annexines I et V ont été préparées par surexpression dans *E. Coli* selon le même protocole que celui qui a été décrit par F. Cordier-Ochsenbein et al. dans *J. Mol. Biol.* 279, 1177-1185.

20 Le cDNA de ces séquences d'annexines a été préparé en utilisant la PCR à partir du cDNA des annexines correspondantes. Le cDNA a été inséré dans le vecteur pGEX-2T (Smith & Jonhson, 1998). La figure 2 est un schéma illustrant l'insertion du cDNA dans le vecteur. L'absence de mutations induites par la PCR a été
25 contrôlée par séquençage. La production du peptide est effectuée en utilisant la souche *E. Coli* BL21 contenant le vecteur d'expression décrit plus haut. Après induction par l'isopropylthiogalactopyranoside (IPTG, 100 µm) jusqu'à une densité optique de 1 à 600 nm, la
30 pousse est continuée jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint, c'est-à-dire pendant environ 3 heures. Après centrifugation, les bactéries sont resuspendues dans le tampon de lyse comprenant 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM

EDTA, 500 mM NaCl, 5% (v/v) glycérol, 1% (v/v) Triton X100, 1 mM dithiothréitol (DTT), 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) et 20 µg/ml aprotinine.

5 La purification a été effectuée de la façon suivante : après sonification et centrifugation à 10000 g, le surnageant contenant les protéines solubles est incubé avec des billes de glutathion/agarose permettant la liaison spécifique à ces billes de la
10 protéine de fusion GST-domaine. Après lavage avec une solution contenant 1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl à pH 8, 70 unités de thrombine par litre de culture sont ajoutés et la séquence est éluée.

15 La séquence est alors purifiée sur une colonne proRPC (marque de commerce) de type 16/10, fournie par la société Pharmacia en utilisant un système FPLC et un gradient linéaire d'eau de qualité Millipore (marque de commerce) contenant 0,1% (v/v) d'acide trifluoroacétique TFA, et d'acétonitrile contenant 0,1%
20 de TFA. La vitesse d'écoulement est ajustée à 2,5 ml/minute. La séquence est ensuite lyophilisée. Le rendement final est d'environ 8 mg de séquence par litre de culture.

25 Exemple 2 : Stabilité de la séquence ID n°1 de l'annexine 1

Différentes expériences montrent que cette séquence constitue une protéine de repliement stable.

30 La figure 3 montre un spectre 1D de RMN ¹H du proton de la séquence ID n°1 isolée de l'annexine 1, en solution aqueuse. La dispersion des fréquences de résonance et la présence de résonances à des déplacements chimiques inférieurs à 0 ppm indiquent

clairement que cette séquence est fortement structurée. De plus, les données de déplacement chimique des protons α révèlent la présence de 5 hélices conformément à la structure cristallographique.

5 La figure 4 montre la dénaturation coopérative du domaine 1 de l'annexine I issu de la séquence ID n°1 par le chlorure de guanidinium, qui est un dénaturant classique et la figure 5 montre la dénaturation coopérative de la séquence par la température.

10 Des données analogues sont obtenues pour les autres séquences décrites précédemment et démontrent que certaines séquences d'annexine se comportent comme de petites protéines de stabilité normale, utilisables directement, ou comme plate-forme, pour l'ingénierie de
15 composés fonctionnels nouveaux.

Exemple 3 : Rôle essentiel du domaine 1 de l'annexine V issu de la séquence ID n°2 dans la liaison de l'annexine V aux membranes

20 Des expériences de liaison de l'annexine V à des systèmes membranaires modèles ainsi que des expériences d'inhibition de la protéine kinase c (PKC) *in vitro*, et de la phospholipase A₂ (PLA₂) cytoplasmique (cPLA₂) *in vivo* démontrent le rôle essentiel joué par le domaine 1
25 dans cette liaison aux membranes.

On prend ici comme exemple le cas de l'inhibition de la cPLA₂. L'inhibition de l'activité phospholipasique par l'annexine V résulte de la déplétion du substrat lipidique commun à ces deux
30 protéines. Divers mutants de l'annexine V ont été construits pour éliminer de façon sélective dans un ou plusieurs domaines la capacité de lier le calcium, c'est-à-dire les phospholipides. La mutation consiste à

remplacer le ligand bidentate du calcium, Glu ou Asp, d'une séquence de la présente invention par un résidu non liant, Gln ou Asn respectivement. Douze mutants ont ainsi été construits et purifiés : M1, M2, M3, M4, 5 M1M2, M1M3, M1M4, M2M3, M1M2M3, M1M2,M4, M2M3M4 et M1M2M3M4, le chiffre indiquant le domaine pour lequel la capacité de lier le calcium a été supprimée. L'ensemble des résultats montre que l'activité phospholipasique de la PLA₂ cellulaire, mesurée par le 10 taux de relarguage d'acide arachidonique, dépend fortement de la présence du site calcium dans le domaine 1 et à un moindre degré dans le domaine 4. La suppression des sites calcium dans les domaines 2 et 3 n'a quasiment aucun effet sur l'inhibition de 15 l'activité phospholipasique de la cPLA₂. (Mira et al. J. Biol. Chem. 1997, 272:10474-10482 ; Dubois et al. Biochem. J. 1998, 330:1277-1282).

Le tableau (I) suivant regroupe certains résultats de cet exemple, et montre le pourcentage de diminution 20 de la liaison des mutants de l'annexine V aux phospholipides par rapport à l'annexine V sauvage.

Annexine V sauvage	M1	M2	M3	M4	M1M2M3	M1M2M2
0	79 ₊₆	38 ₊₄	47 ₊₉	38 ₊₆	98 ₊₁	85 ₊₇

Ce tableau (I) montre la liaison aux membranes de 25 l'annexine V et de ses mutants M1, M2, M3, M4, M1M2M3 et M1M2M4. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution de la capacité de liaison par rapport à l'annexine V sauvage (valeur moyenne ₊ erreur standard). Pour les mutants M123 et M124, le taux de 30 liaison résiduel n'est pas significatif.

Exemple 4 : Utilisation de la structure chimique de la présente invention

Trois voies d'utilisation sont prévues : i) simple ingénierie des domaines pour satisfaire aux diverses
5 exigences liées à leur utilisation comme outils de recherche, de diagnostic et de thérapeutique ; ii) "re-design" de la plate-forme qui constitue la topologie du domaine en une nouvelle plate-forme plus simple et synthétisable par voie chimique ou par génie
10 génétique ; iii) remplacement de la plate-forme peptidique ou peptoïdique par une structure organique non-peptidique pour la fabrication d'un médicament. Dans les trois cas, il s'agit naturellement de conserver, voire d'améliorer, la localisation spatiale
15 des fonctions de liaison avec les phospholipides, décrits plus haut.

1) Ingénierie des domaines d'annexines

Les domaines d'annexines de la présente invention
20 constituent des plates-formes peptidiques. On entend par ingénierie la modification de la séquence des domaines par mutagenèse afin d'améliorer la stabilité générale de la molécule et de l'adapter aux conditions physico-chimiques imposées par l'utilisation,
25 d'améliorer son affinité pour le ligand phospholipidique, et lui conférer une spécificité propre à chaque phospholipide. Il s'agit aussi de permettre l'introduction de différents marqueurs pour les différentes applications dont il est question plus
30 loin. Nos connaissances actuelles sont largement suffisantes pour effectuer une telle ingénierie.

Les exemples d'un changement de propriété ont été illustrés dans l'exemple 4 Ils ont été obtenus par une

technique classique de génie génétique en mutant les acides aminés impliquées.

2) "Re-design" des plates-formes peptidiques

5 Le "re-design" de la plate-forme consiste à redéfinir une architecture moléculaire, tout en gardant la topologie convenable des résidus impliqués dans la liaison au calcium et aux phospholipides. L'intérêt du "re-design" est de créer une plate-forme de séquence
10 plus courte pouvant être produite par synthèse chimique. La synthèse d'un peptide de la taille d'un domaine est possible mais reste difficile. La réduction par deux du nombre de résidus, soit environ 35 résidus, rend par contre la synthèse couramment réalisable. Dans
15 cette opération de "re-design", on conserve assez précisément la géométrie permettant des interactions avec le phospholipide, et notamment la disposition des résidus de la séquence annexine. Ces résidus sont ceux indiqués en gras sur les figures 6a à 6d pour les
20 annexines (I) à (V).

Cet ensemble comprend deux résidus basiques, généralement Arg-x-x-x-Lys, à la fin de l'hélice A du domaine concerné et une série de résidus acides, basiques et neutres, généralement
25 Arg-x-x-x-x-Asp-x-x-Ser-Asp, situés dans l'hélice D. L'étude de la structure moléculaire montre, figures 7 et 8, que ces résidus sont parfaitement disposés pour lier une molécule de phosphatidylsérine. Le groupe carboxylate de ce lipide est lui-même lié à l'atome de
30 calcium situé dans la boucle AB et désigné dans la suite par "site calcium AB".

La séquence :

Arg-x-x-x-Lys(hélice A)----Arg-x-x-x-x-Asp-x-x-Ser-Asp(hélice D)

5 associée à celle du site calcium AB, constitue donc une
séquence consensus pour la liaison de la
phosphatidylsérine dans les composés de la présente
invention. Pour généraliser, on désignera maintenant
cette séquence par :

10

RL1-x-x-x-RL2----RL3-x-x-x-x-RL4-x-x-RL5-RL6

où RL1 à RL6 sont les résidus ligands essentiels dans
la liaison de la phosphatidylsérine indiqués en gras
15 dans les séquences des figures 6a à 6d et indiqué dans
les composés de structure (I) à (VI). La séquence
consensus du site calcium AB est la suite :

Met-Lys-Gly-x-Gly-Thr----Asp(ou Glu)

20

Les ligands du calcium sont les groupes carboxyl
peptidiques des résidus en italique (résidus de la
boucle AB) sur la figure et les deux atomes d'oxygène
du groupe carboxylate de la chaîne latérale du résidu
25 Asp (ou Glu) de la fin de l'hélice D, dénommé aussi
ligand bidentate. En généralisant ces ligands du
calcium seront maintenant désignés par :

RCa1-RL2-RCa2-x-RCa3-Thr----(RCa4RCa5) ou RL6

30

Dans le cas de l'annexine, RCa4 et RCa5
constituent un seul et même résidu déjà identifié
précédemment comme RL6.

Les données de distances interatomiques entre les résidus ligands sont donnés dans le tableau (II) suivant en référence à la figure 7 en annexe et les interactions précises domaine-calcium-phosphatidylsérine sont indiquées dans le tableau (III) suivant en référence à la figure 8 en annexe.

Sur la figure 8, Ch1 et Ch2 représentent la position d'éventuelles chaînes carbonnées du phospholipide. Ces chaînes peuvent être celles décrites, par exemple l'acide arachidonique.

Selon l'invention, la structure chimique peut être constituée de la façon suivante :

a) elle comporte en particulier au moins 6 résidus, dits résidus ligands, nommés RL1 à RL6 et dont la nature est la suivante :

RL1 = Arg ou Lys ou Orn
 RL2 = Arg ou Lys ou Orn
 RL3 = Arg ou Lys ou Orn
 RL4 = Asp ou Glu
 RL5 = Ser ou Thr ou Asp ou Glu
 RL6 = Arg ou Lys ou Orn

b) les carbones α des résidus ligands RL1 à RL6 sont disposés dans l'espace de manière à ce que les chaînes latérales soient directement accessibles aux phospholipides,

c) les carbones α des résidus ligands RL1 à RL6 sont disposés selon le tableau II de distances suivant :

Carbone α	RL2	RL3	RL4	RL5	RL6
RL1	0,45 à 0,65	0,7 à 1,2	0,7 à 1,0	0,85 à 1,15	0,65 à 0,95
RL2		0,5 à 1,05	0,8 à 1,2	1,2 à 1,7	0,9 à 1,4
RL3			0,5 à 0,8	1,0 à 1,3	1,2 à 1,7
RL4				0,45 à 0,75	0,7 à 1,2
RL5					0,4 à 1,2

d) les chaînes latérales des résidus ligands RL1 à LR6 permettent d'établir un réseau de liaisons hydrogène avec la phosphatidylsérine selon le schéma où les flèches -----> désignent au moins une liaison hydrogène, figure 8, dans le sens donneur vers accepteur et L1 à L6 désignent les ligands de la phosphatidylsérine selon la liste suivante :

- 10 L1 = NZLys ou CZArg de LR1
 L2 = NZLys ou CZArg de LR2
 L3 = NZLys ou CZArg de LR3
 L4 = CGAsp ou CDGlu de LR4
 L5 = CB de Ser ou Thr ou CG de Asp ou CD de Glu de LR5
 15 L6 = NZLys ou CZArg de LR6

HN = H

NZ = N zeta

CZ = C zeta

20 OD = O delta

OG = O gamma

OE = O epsilon

où les distances entre les ligands L1 à L6 et les atomes de la phosphatidylsérine sont données dans le tableau III suivant :

5 Distances nm x 10

	N	C β	C γ	O1	O2	O3	O4	Cl chaîne Ch1	Cl chaîne Ch2
L1	0,35 à 0,65	0,3 à 0,5	0,25 à 0,45	0,2 à 0,35	0,25 à 0,5	0,35 à 0,6	0,2 à 0,35	0,4 à 0,7	0,5 à 0,8
L2	0,55 à 0,85	0,45 à 0,75	0,45 à 0,75	0,4 à 0,6	0,2 à 0,4	0,4 à 0,6	0,25 à 0,45	0,7 à 1,1	0,7 à 1,1
L3	0,4 à 0,6	0,4 à 0,6	0,45 à 0,75	0,4 à 0,6	0,2 à 0,4	0,2 à 0,35	0,25 à 0,5	0,7 à 1,1	0,6 à 1,0
L4	0,25 à 0,45	0,3 à 0,5	0,35 à 0,55	0,55 à 0,85	0,5 à 0,75	0,4 à 0,65	0,4 à 0,6	0,8 à 1,2	0,8 à 1,2
L5	0,25 à 0,5	0,45 à 0,65	0,5 à 0,75	0,65 à 0,95	0,65 à 0,95	0,5 à 0,8	0,5 à 0,9	0,8 à 1,2	0,6 à 1,0
L6	0,3 à 0,5	0,35 à 0,55	0,3 à 0,45	0,65 à 0,95	0,7 à 1,0	0,65 à 0,95	0,5 à 0,8	0,6 à 1,0	0,8 à 1,2

Pour le ligand L1, deux au moins des cinq distances indiquées dans ce tableau sont de préférence respectées.

3) Plate-forme organique

La troisième étape constitue l'étape ultime pour l'obtention d'un médicament facilement utilisable par voie orale. Il s'agit du remplacement de la plate-forme peptidique par une structure organique respectant la disposition spatiale des ligands phospholipidiques. Les ligands calciques et phospholipidiques ne sont plus des

résidus aminoacides mais des fonctions chimiques reproduisant les interactions décrites plus haut.

Les structures organiques couramment utilisées en pharmacologie peuvent permettre de construire des
5 plates-formes rigides capables de présenter un site de liaison pour le phospholipide selon l'invention. Ces structures peuvent être constituées par les techniques chimiques classiques connues de l'homme du métier, qu'il n'est pas nécessaire ici de rappeler.

10

Exemple 5 :

De manière très avantageuse, l'utilisation d'une structure ou d'un assemblage de la présente invention peut se faire comme indiqué précédemment dans trois
15 directions : recherche, diagnostic et thérapeutique.

1) la recherche

Pour ces expériences, il convient de coupler une structure de la présente invention à une molécule de
20 marquage permettant une détection. Ces molécules de marquage peuvent être celles précitées par exemple des molécules fluorescentes, un système avidine-biotine, des radioéléments, et de manière générale, celles couramment utilisées.

25

2) le diagnostic

Les structures chimiques et assemblages de la présente invention peuvent comme indiqué précédemment être utilisés pour la détection "in vitro" de
30 pathologies impliquant l'apparition de charges négatives à la surface des cellules et la libération dans le sang de microvésicules : par exemple les

troubles de la coagulation, les pathologies inflammatoires aiguës, etc...

Ils peuvent aussi être couplés à des radioéléments à vie courte et détection "in vivo" de la localisation
5 des zones thrombotiques lors d'accidents vasculaires de toute sorte, en particulier cérébraux, utilisant des systèmes d'imagerie.

Ils peuvent aussi être couplés à des composés paramagnétiques, par exemple un complexe de gadolinium,
10 et détection "in vivo" de la localisation des zones thrombotiques lors d'accidents vasculaires de toute sorte, en particulier cérébraux, utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Les couplages précités peuvent être réalisés par
15 les techniques classiques de chimie organique connues de l'homme du métier, qu'il n'est pas utile ici de rappler.

3) le médicament

20 Les structures et assemblages de la présente invention peuvent être utilisés en tant que tels pour fabriquer un médicament utilisable pour un traitement ou pour une prophylaxie car ils possèdent des propriétés anticoagulante, antithrombolytique et anti-
25 inflammatoire intrinsèques.

Les assemblages selon l'invention permettent d'effectuer un tapissage des surfaces cellulaires, capable d'interdire l'accès de composés impliqués dans les étapes primaires de la coagulation sanguine et les
30 phénomènes inflammatoires à ces surfaces.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent également être utilisés pour le

ciblage de molécules à un site du thrombus, de l'inflammation, ou vers une zone tumorale.

Dans cette utilisation, les structures et assemblages de la présente invention sont couplés à une
5 molécule qui a une action thrombolytique, à une molécule qui a une action anti-inflammatoire, ou à une molécule qui a une action anti-tumorale respectivement.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent donc être utilisés par exemple pour
10 fabriquer un médicament utilisable dans le traitement et la prophylaxie de la thrombose. Le couplage des structures et assemblages à des molécules à action thrombolytique permet un ciblage de ces dernières vers les zones thrombogènes. Les molécules thrombolytiques
15 telles que les streptokinases, les urokinases, et les activateurs du plasminogène peuvent être utilisées.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent aussi être utilisés couplés à une molécule ayant une action anti-inflammatoire pour
20 fabriquer un médicament utilisable par exemple par voie locale ou par voie orale dans des pathologies aiguës comme l'asthme, la RCH, le Crohn, le choc septique, les maladies du collagène et l'arthrite.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent aussi être utilisés couplés à une
25 molécule ayant une action antitumorale. Ce couplage permet de cibler ces dernières molécules vers des zones présentant des charges négatives telles que des tumeurs possédant des foyers cellules apoptotiques, des tumeurs
30 inflammatoires, etc...

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent également être utilisés pour fabriquer un matériau de recouvrement de biomatériaux

susceptibles d'être thrombogènes. Un biomatériau thrombogène ainsi recouvert perd ses propriétés thrombogènes. Le biomatériau thrombogène peut être par exemple une valve cardiaque.

5 L'invention propose d'utiliser une structure chimique dérivée des protéines de la famille des annexines et leurs domaines isolés, modifiés ou non, capables de se lier réversiblement aux effecteurs lipidiques tel que les phosphatidylsérines, les acides
10 phosphatidiques, les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylinositophosphates. Il s'agit de fournir un ensemble de composés protéiques, peptidiques, peptoides et organiques dont la propriété principale est de reconnaître spécifiquement l'apparition des signaux
15 lipidiques à la surface des membranes cellulaires en relation avec le fonctionnement normal ou pathologique des tissus. Les pathologies spécialement visées par l'invention sont : (i) les troubles de la coagulation sanguine, (ii) les phénomènes d'apoptose consécutifs à
20 l'action de composés chimiques, d'effets physiques comme les radiations ionisantes, d'effets biologiques comme ceux liés à la formation ou la nécrose des tissus cancéreux, outre les phénomènes normaux d'apoptose, (iii) les pathologies inflammatoires aiguës et (iv) les
25 troubles associés aux relations entre les cellules et la matrice extra-cellulaire et notamment le collagène.

Outre l'ingénierie complète des annexines entières, un des aspects de l'invention est l'utilisation de domaines et de modules covalents
30 d'annexines soit directement soit comme plate-forme pour l'ingénierie de composés peptidiques fonctionnels. Il s'agit donc d'utiliser ces domaines et modules soit sous leur forme naturelle, soit modifiés par les voies

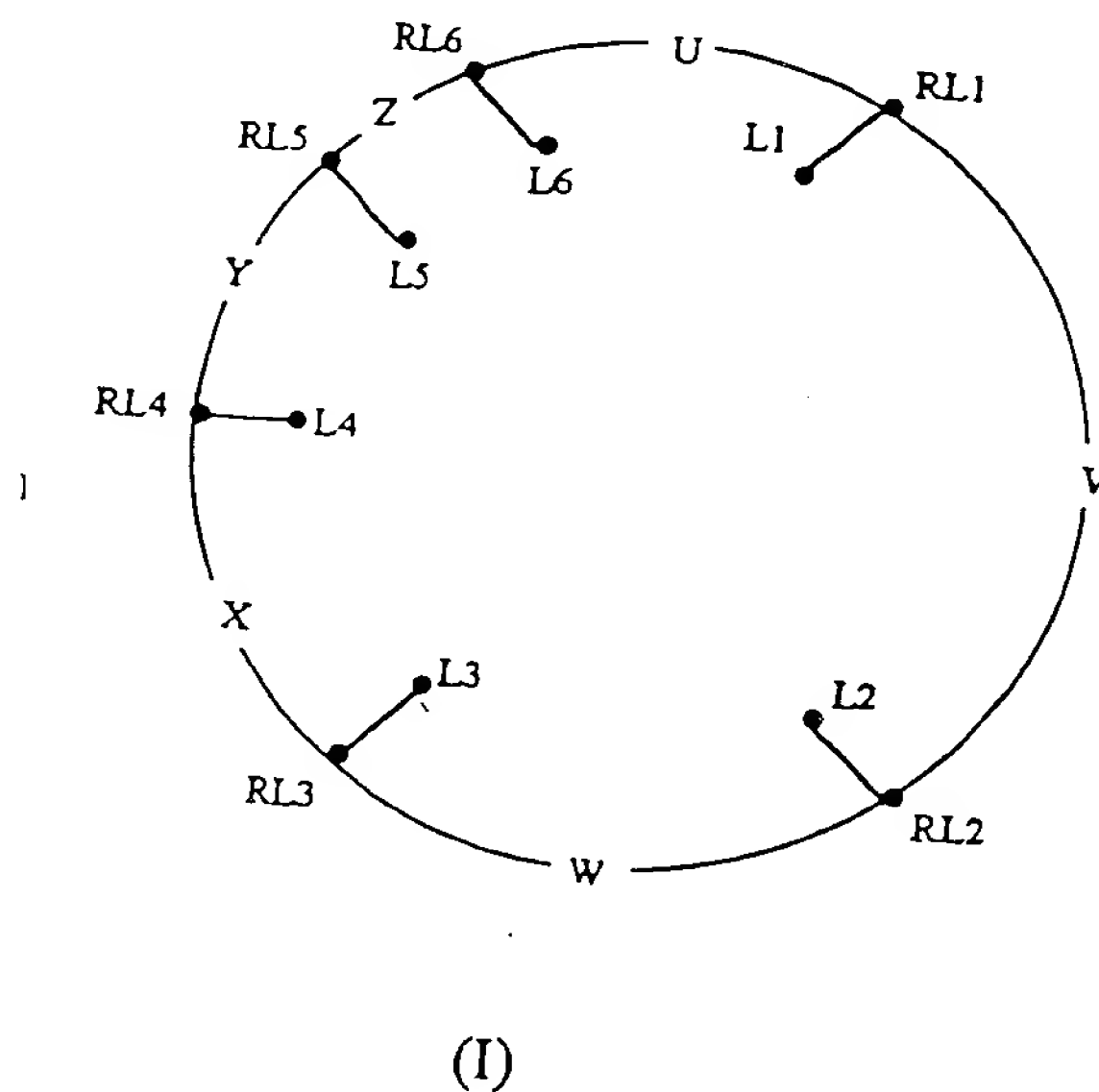
de la mutagénèse ou de la chimie, pour en faire des composés répondant aux critères biologiques exposés dans le paragraphe précédent.

De par leur faible taille, ces domaines peuvent
5 être facilement associés à d'autres protéines soit pour former des protéines chimères multifonctionnelles, soit pour introduire un mécanisme de régulation par des effecteurs autres que les phospholipides de signalisation. De plus, l'invention se propose de
10 redéfinir, par les méthodes de l'ingénierie des protéines, la spécificité des domaines pour les différents lipides de signalisation évoqués plus haut.

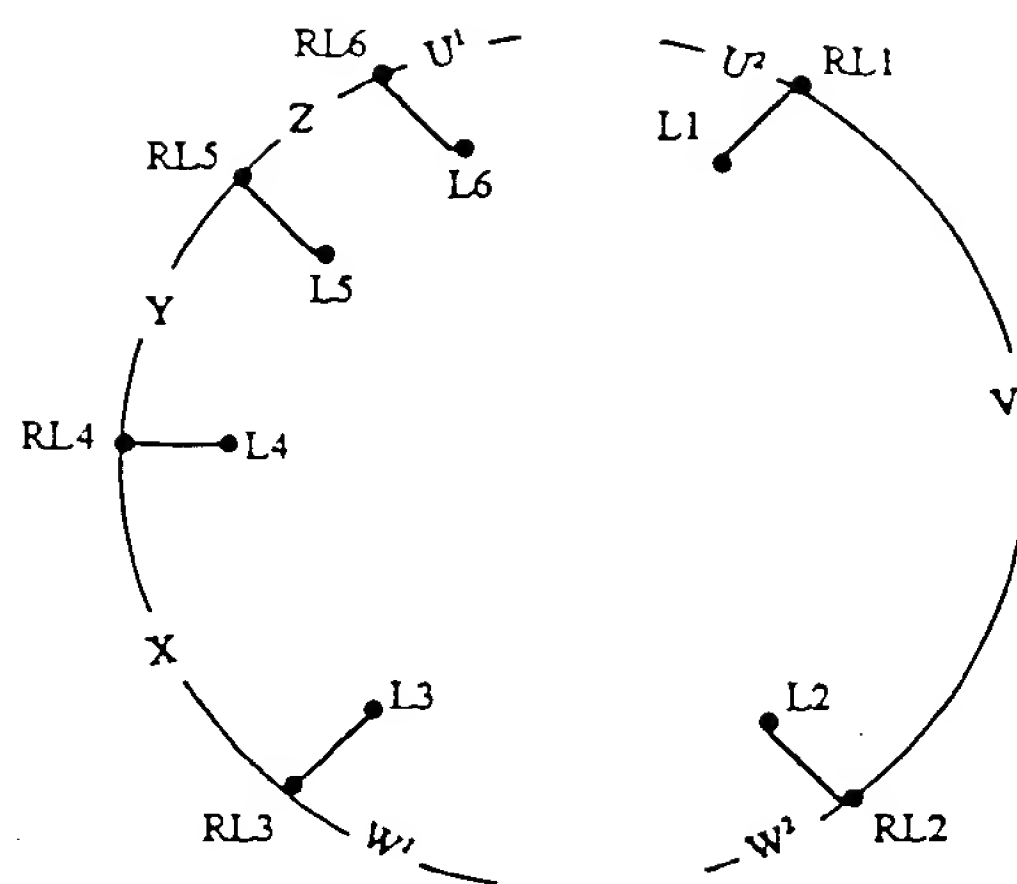
L'invention propose enfin de reconstruire ces domaines, par de novo design, pour en faire des
15 composés de taille plus restreinte et accessible à la synthèse peptidique et en particulier à l'introduction de résidus aminoacides non naturels dans le but d'augmenter la durée de vie de ces composés dans l'organisme.

REVENDICATIONS

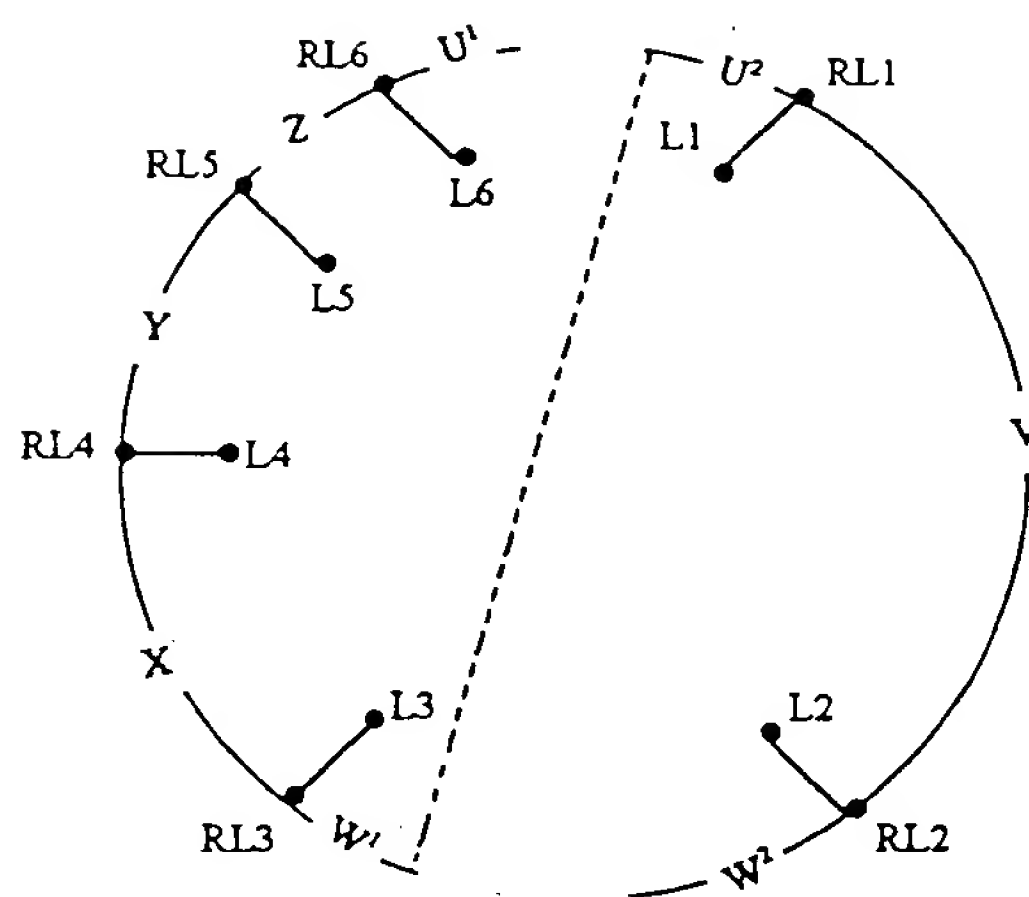
1. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique U, V, W, X, Y comportant six résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, ces fonctions chimiques L définissant au moins en partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (I), (II) et (III) suivantes :



15



(II)



(III)

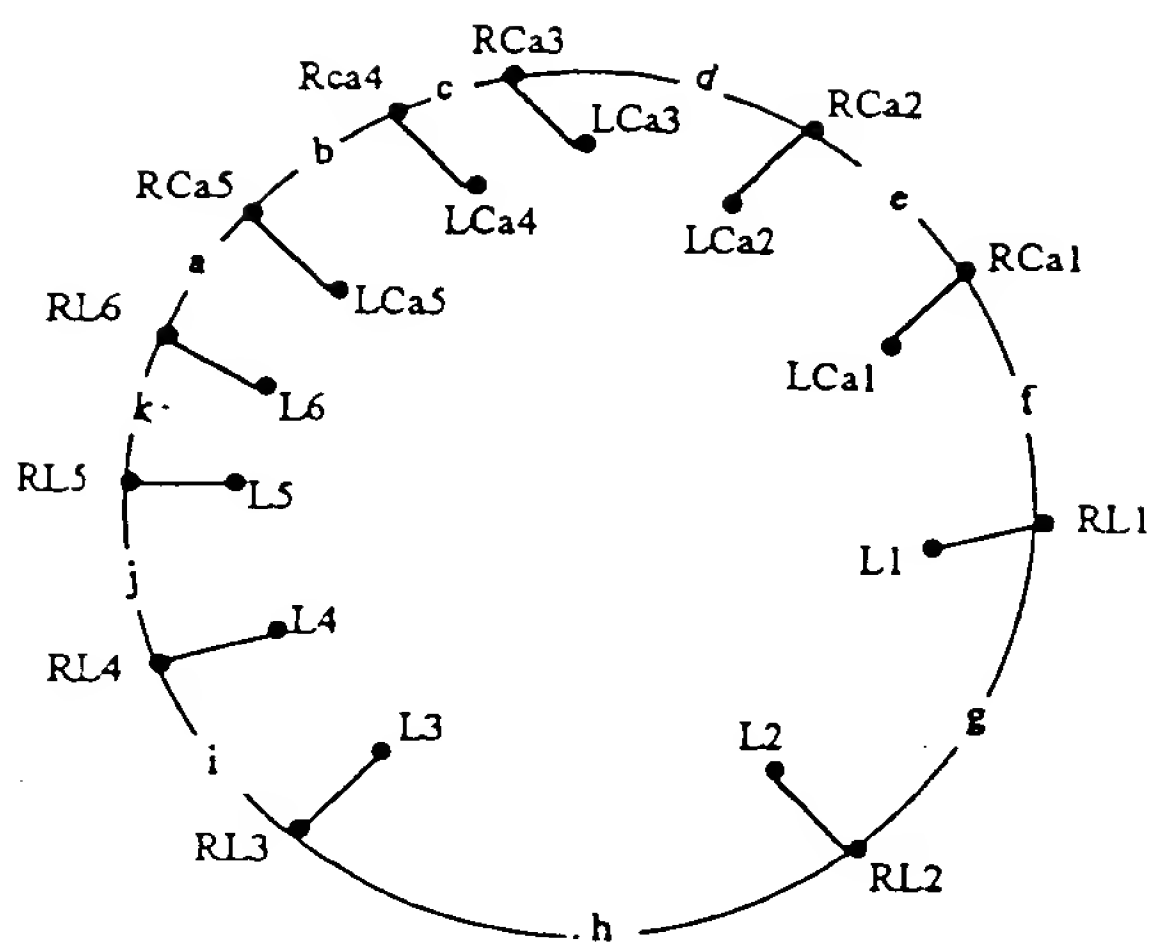
5

dans lesquelles U , U^1 , U^2 , V , W , W^1 , W^2 , X , Y , Z sont indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel, un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s) cyclique(s) carboné(s),

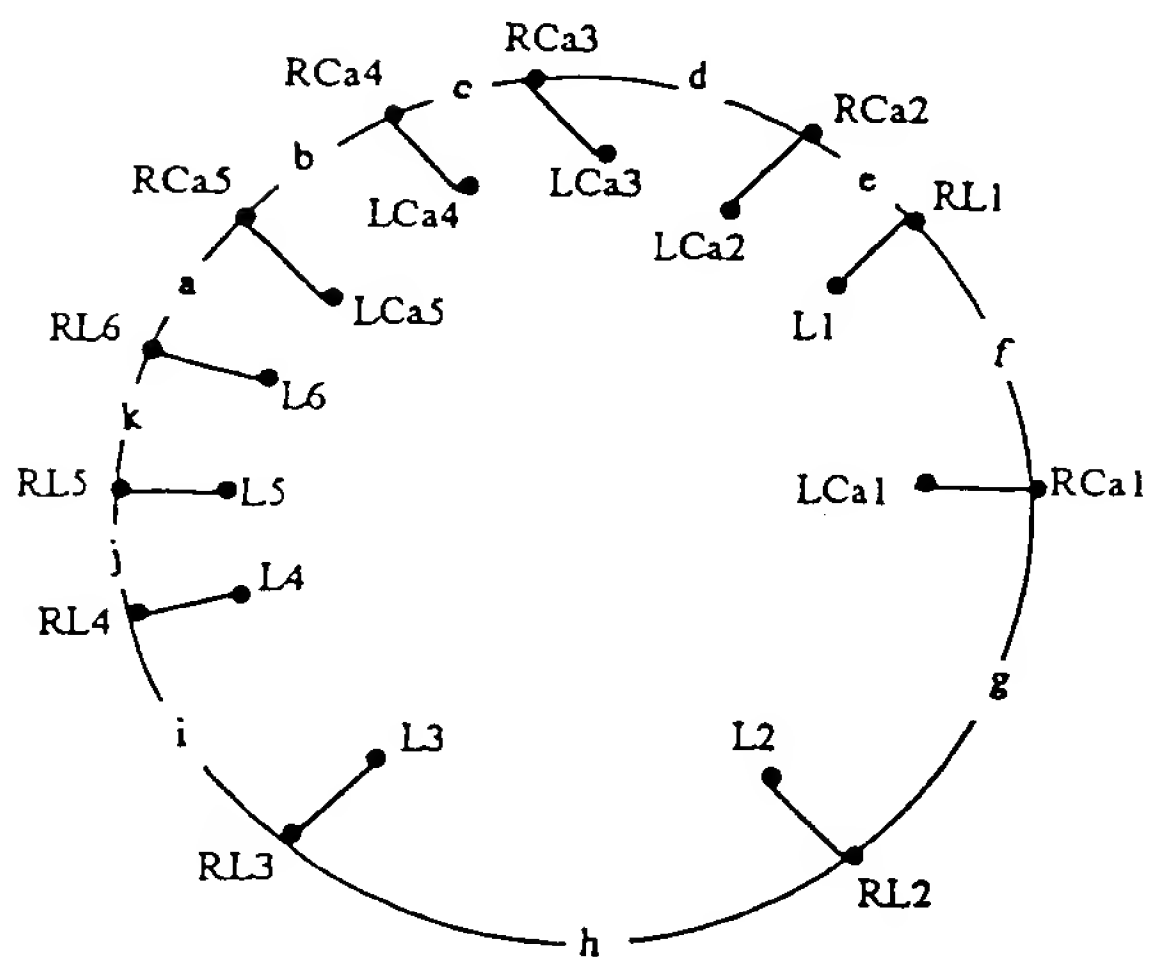
10

dans lesquelles RL1 à RL6 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement, lesdites fonctions chimiques comprenant soit au moins une charge positive et
 5 donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, et dans lesquelles U, U¹, U², V, W, X, Y et Z sont tels que RL6 et RL1 sont distants de 0,65 à 0,95 nm, L6 et L1 sont distants de 0,65 à 0,9 nm, RL1 et RL2 sont
 10 distants de 0,45 à 0,65 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de
 15 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm.

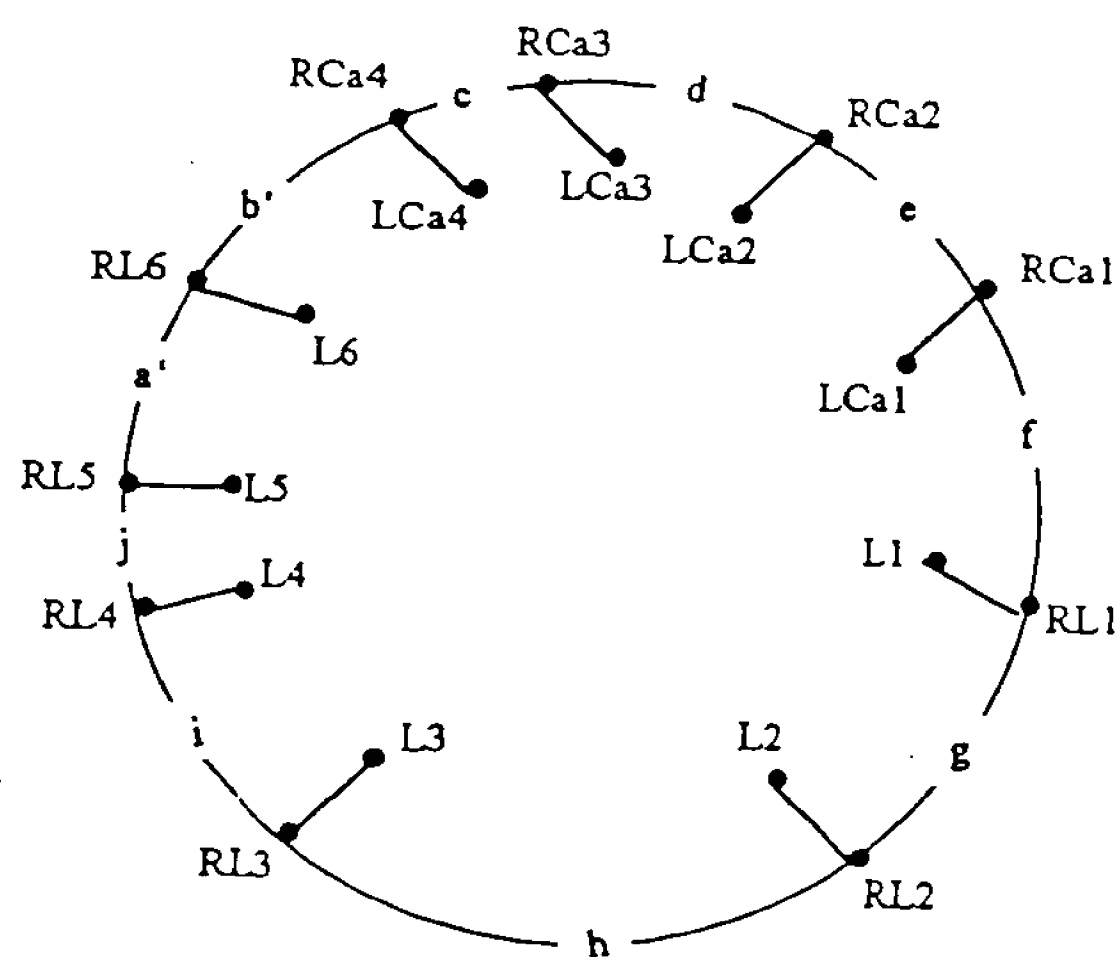
2. Structure chimique ayant une affinité pour un
 20 phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l comportant 11 résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6, RCa1, RCa2, RCa3, RCa4 et RCa5 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant
 25 se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, et un ensemble de fonctions chimiques de liaison à un atome de calcium appelées LCa1, LCa2, LCa3, LCa4, LCa5 respectivement, ces fonctions chimiques RL1 à RCa5 définissant au moins en
 30 partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (IV), (V) et (VI) suivantes :



(IV)



(V)



(VI)

dans lesquelles a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l sont indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel, un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s) cyclique(s) carboné(s),

dans lesquelles RL1 à RL6 et RCa1 à RCa5 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 et LCa1 à LCa5 respectivement, lesdites fonctions chimiques L1 à L6 comprenant soit au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, lesdites fonctions chimiques LCa1 à LCa5 comprenant un atome d'oxygène, et dans lesquelles a dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RL6 et RCa5 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa5 sont distants de 0 à 0,3 nm, b dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RCa5 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que LCa5 et LCa4 sont distants de 0,2 à 0,3 nm, b' dans la structure de construction (VI) est

tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, c et d sont tels que RCa4 et RCa3 sont distants de 0,5 à 0,9 nm, LCa4 et LCa3 sont distants de 0,2 à 0,4 nm, 5 RCa3 et RCa2 sont distants de 0,35 à 0,6 nm, et LCa3 et LCa2 sont distants de 0,22 à 0,3 nm, e, f, g, dans les structures de construction (IV), (V), (VI) sont tels que RL1 et RL2 sont distants de 0,45 à 0,65 nm, RCa1 à RCa2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, L1 et L2 sont 10 distants de 0,4 à 0,55 nm et LCa1 et LCa2 sont distants de 0,3 à 0,4 nm, h, i, j et k sont tels que RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et 15 RL5 sont distants de 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, a' dans la structure de construction (VI) est tel que RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm et tel 20 que L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, et b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, la structure pouvant être soit fermée, soit ouverte en a et/ou en h.

25

3. Structure chimique selon la revendication 1, dans laquelle L1, L2, L3 et L6 présentent chacun au moins une charge positive et donneuse de liaisons hydrogène, et L4 et L5 présentent chacun au moins une 30 charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

4. Structure chimique selon la revendication 2, dans laquelle L1, L2, L3 et L6 présentent chacune au

moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4, L5, LCa5, LCa4, LCa3, LCa2 et LCa1 présentent chacune au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

5

5. Structure chimique selon la revendication 1, dans laquelle U, V, W, X, Y et Z sont des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 étant les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés.

15 6. Structure chimique selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Arg, Lys, Orn, dans laquelle RL4 est choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et
20 dans laquelle RL5 est choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, les chaînes latérales de ces acides aminés présentant les fonctions chimiques de liaison au phospholipide L1 à L6 respectivement.

25 7. Structure chimique selon la revendication 3 ou 4, dans laquelle RL1 à RL6 sont disposés dans l'espace formé par U, V, W, X, Y, Z de manière à ce que les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement de leur chaîne latérales soient directement accessibles
30 au phospholipide chargé négativement.

8. Structure chimique selon la revendication 1, comprenant en outre un site calcium où l'ion calcium

complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide.

9. Structure chimique selon la revendication 2,
5 dans laquelle a ou a', b ou b', c, d, e, f, g, h, i, j, k sont des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6
10 et LCa1 à LCa5 étant les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés, et RCa1 à RCa5 étant des acides aminés naturels ou non naturels.

10. Structure chimique selon la revendication 8,
15 dans laquelle RL1 à RL6 et RCa1 à RCa2 sont disposés dans l'espace formé par a, b, c, d, e, f, g, h, i, j et k de manière à ce que les fonctions chimiques de liaisons L1 à L6 respectivement et les charges positives du calcium lorsqu'il est lié aux fonctions de
20 liaison LCa1 à LCa5 soient directement accessibles au phospholipide.

11. Structure chimique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle au moins une
25 partie de la plate-forme est une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, comprenant au moins un desdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement de liaison au phospholipide.

30

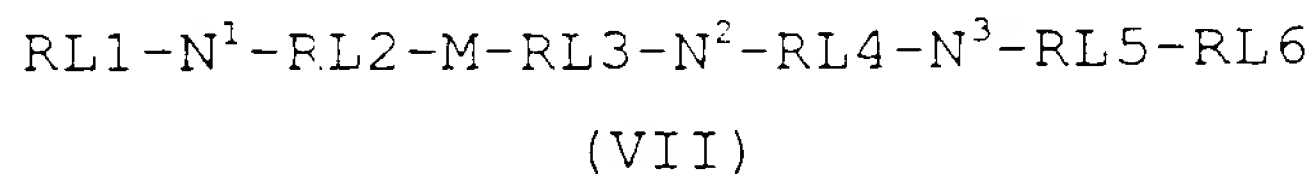
12. Structure chimique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans laquelle la plate-forme est une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine

modifié de l'annexine, comprenant lesdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement.

5 13. Structure chimique selon la revendication 12, dans laquelle le domaine de l'annexine est choisi parmi le domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, le domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, le domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure
10 6c et le domaine 1 et 2 de l'annexine IV présentés sur la figure 6d.

 14. Structure chimique selon la revendication 13, dans laquelle les résidus ligands RL1 à RL6 sont
15 respectivement soit, les résidus Arg25, Lys29, Arg63, Asp68, Ser71 et Glu 72 du domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, soit les résidus Arg124, Lys128, Arg162, Asp167, Ser170 et Asp171 du domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, soit les
20 résidus Lys100, Lys104, Lys138, Asp143, Ser146 et Glu147 du domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 6c, soit les résidus Arg97, Lys101, Arg135, Asp140, Ser143 et Asp144 du domaine 2 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d, soit les résidus Arg24,
25 Lys28, Arg62, Asp67, Ser70 et Glu71 du domaine 1 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d.

 15. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend une
30 molécule de formule (VII) suivante :



dans laquelle N^1 à N^3 représentent chacun indépendamment de 1 à 4 acides aminés choisis indépendamment, naturels ou non naturels, et dans laquelle M est un peptide
5 constitué de 1 à 100 acides aminés naturels ou non naturels ;

dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn ; RL4 est choisi indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 est choisi
10 indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, ladite structure étant linéaire ou cyclique.

16. Structure selon la revendication 15, dans laquelle N^1 représente trois acides aminés, N^2
15 représente quatre acides aminés, et N^3 représente deux acides aminés.

17. Structure selon la revendication 15 ou 16, dans laquelle M est un peptide constitué de 33 acides
20 aminés naturels ou non naturels.

18. Structure selon la revendication 15, dans laquelle la molécule de formule (VII) est une séquence peptidique choisie parmi la séquence peptidique allant
25 de Arg124 à Ser171 dans la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence peptidique allant de Arg25 à Glu72 dans la séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence peptidique allant de Lys100 à Glu147 dans la séquence ID n°3 présentée sur la figure
30 6c, la séquence allant de Arg24 à Glu71 dans la séquence ID n°4 présentée sur la figure 6d, la séquence allant de Arg97 à Asp144 dans la séquence ID n°5 présentée sur la figure 6, ou une séquence modifiée de

ces séquences pourvu que RL1, RL2, RL3 et RL6 soient choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn, RL4 soit choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et RL5 soit choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu.

5

19. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'une séquence peptidique choisie parmi la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la
10 séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c et les séquences ID n°4 et ID n°5 présentées sur la figure 6d, ou une séquence modifiée de celle-ci.

15

20. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide chargé négativement, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence peptidique cyclique de formule (VIII) suivante :

20 $\overline{\text{Gly-RL1-Phe-RL2-P}^1\text{-Gly-Tyr-P}^2\text{-RL3-P}^3\text{-RL4-Q}^1\text{-RL5-Trp-RL6}}$

dans laquelle RL1 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Orn et Arg ; RL2 et RL3 sont Arg ; RL4 et RL5 sont choisis indépendamment parmi Asp et Glu ;
25 dans laquelle P^1 , P^2 et P^3 sont choisis indépendamment parmi Ser et Thr ; dans laquelle Q^1 est choisi parmi Gly et Met.

21. Structure chimique selon l'une quelconque des
30 revendications 15 à 19, comprenant en outre un site calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide chargé négativement.

22. Structure selon l'une quelconque des revendications précédentes, ladite structure ayant une affinité pour un phospholipide choisi parmi une phosphatidylsérine, une phosphatidyléthanolamine, un
5 phosphatidylinositol, un acide phosphatidique, et un cardiolipide.

23. Assemblage chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisé en ce qu'il comprend au
10 moins deux structures chimiques définies dans les revendications 1 à 22, identiques ou différentes, lesdites structures étant liées.

24. Assemblage chimique selon la revendication 23,
15 dans lequel au moins une des structures chimiques est une des structures chimiques définies dans les revendications 15 à 22.

25. Procédé de fabrication d'une structure
20 chimique définie dans l'une quelconque des revendications 11 à 22 précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de préparation d'un cDNA comprenant une séquence de base codant pour ladite structure chimique, d'insertion du cDNA dans un vecteur
25 d'expression approprié, de transformation d'une cellule hôte appropriée pour une répllication du plasmide et la fabrication de ladite structure par traduction dudit cDNA.

30 26. Procédé selon la revendication 25, dans lequel le vecteur est un plasmide.

27. Procédé selon la revendication 25, dans lequel le vecteur est le vecteur pGEX-2T.

28. Procédé selon la revendication 25, 26 ou 27,
5 dans lequel la cellule hôte appropriée est *E. Coli*.

29. Utilisation d'une structure chimique telle que définie dans les revendications 1 à 22 pour préparer un médicament.

10

30. Utilisation d'un assemblage chimique tel que défini dans la revendication 23 ou 24 pour préparer un médicament.

15

31. Utilisation selon la revendication 29 ou 30, dans laquelle le médicament est choisi parmi un médicament destiné au traitement d'une thrombose, un médicament destiné au traitement d'une tumeur, un médicament ayant une action anti-inflammatoire.

20

32. Utilisation d'une structure telle que définie dans les revendications 1 à 21 pour la fabrication d'un matériau de recouvrement d'un biomatériau thrombogène.

25

33. Composé de marquage caractérisé en ce qu'il comprend une structure telle que définie dans les revendications 1 à 22 couplée à une molécule de marquage.

30

34. Composé de marquage caractérisé en ce qu'il comprend un assemblage tel que défini dans la revendication 23 ou 24 couplé à une molécule de marquage.

35. Composé selon la revendication 33 ou 34 dans lequel la molécule de marquage est choisie parmi une molécule fluorescente, le complexe avidine-biotine, un
5 radioélément, et un composé paramagnétique.

36. Trousse de diagnostic comprenant un composé selon l'une quelconque des revendications 33 à 35.

10 37. Trousse de diagnostic selon la revendication 35, comprenant en outre un réactif adéquat permettant de détecter ladite molécule de marquage.

15 38. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 couplée à un marqueur.

20 39. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 23 ou 24 couplé à un marqueur.

25 40. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 couplée à un marqueur.

30 41. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 23 ou 24 couplé à un marqueur.

35. Composé selon la revendication 33 ou 34 dans lequel la molécule de marquage est choisie parmi une molécule fluorescente, le complexe avidine-biotine, un radioélément, et un composé paramagnétique.

5

36. Trousse de diagnostic comprenant un composé selon l'une quelconque des revendications 33 à 35.

10 37. Trousse de diagnostic selon la revendication 36, comprenant en outre un réactif adéquat permettant de détecter ladite molécule de marquage.

15 38. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 couplée à un marqueur.

20 39. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 23 ou 24 couplé à un marqueur.

25 40. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 couplée à un marqueur.

30 41. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 23 ou 24 couplé à un marqueur.

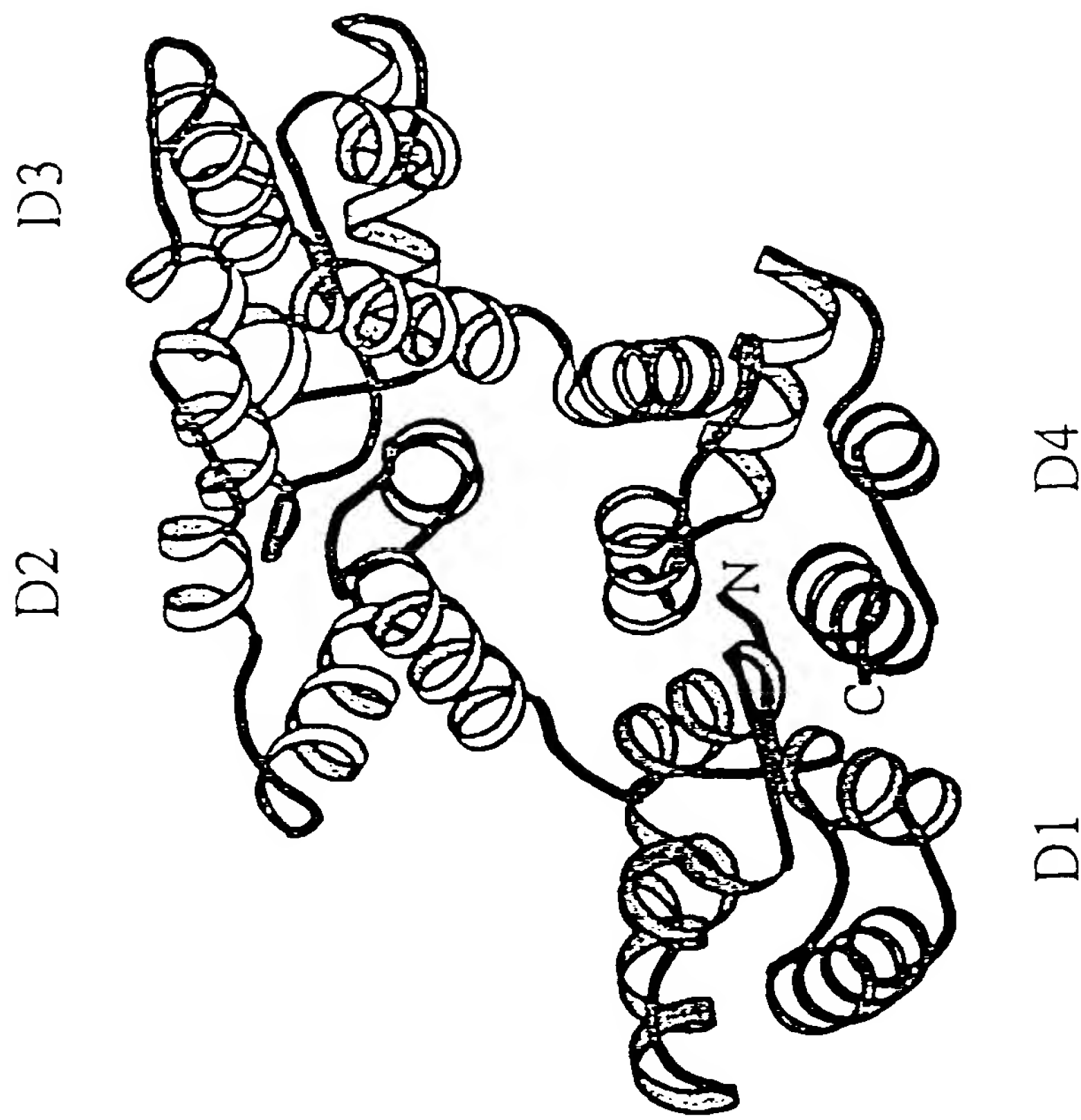


FIG.1A

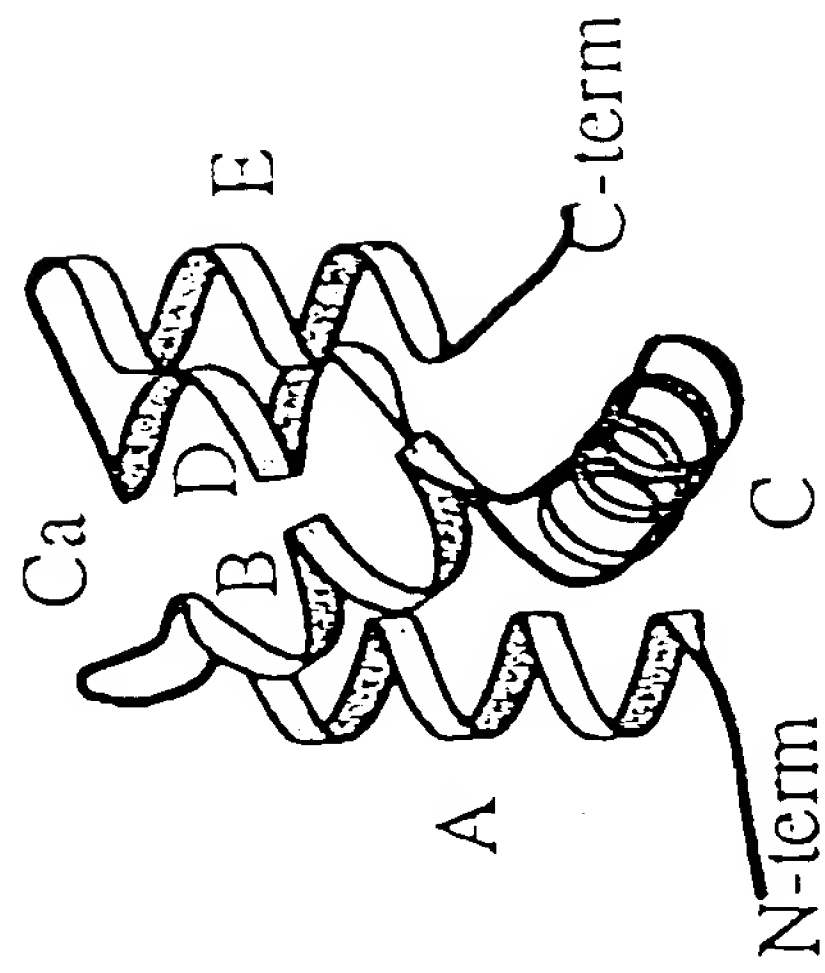


FIG.1B

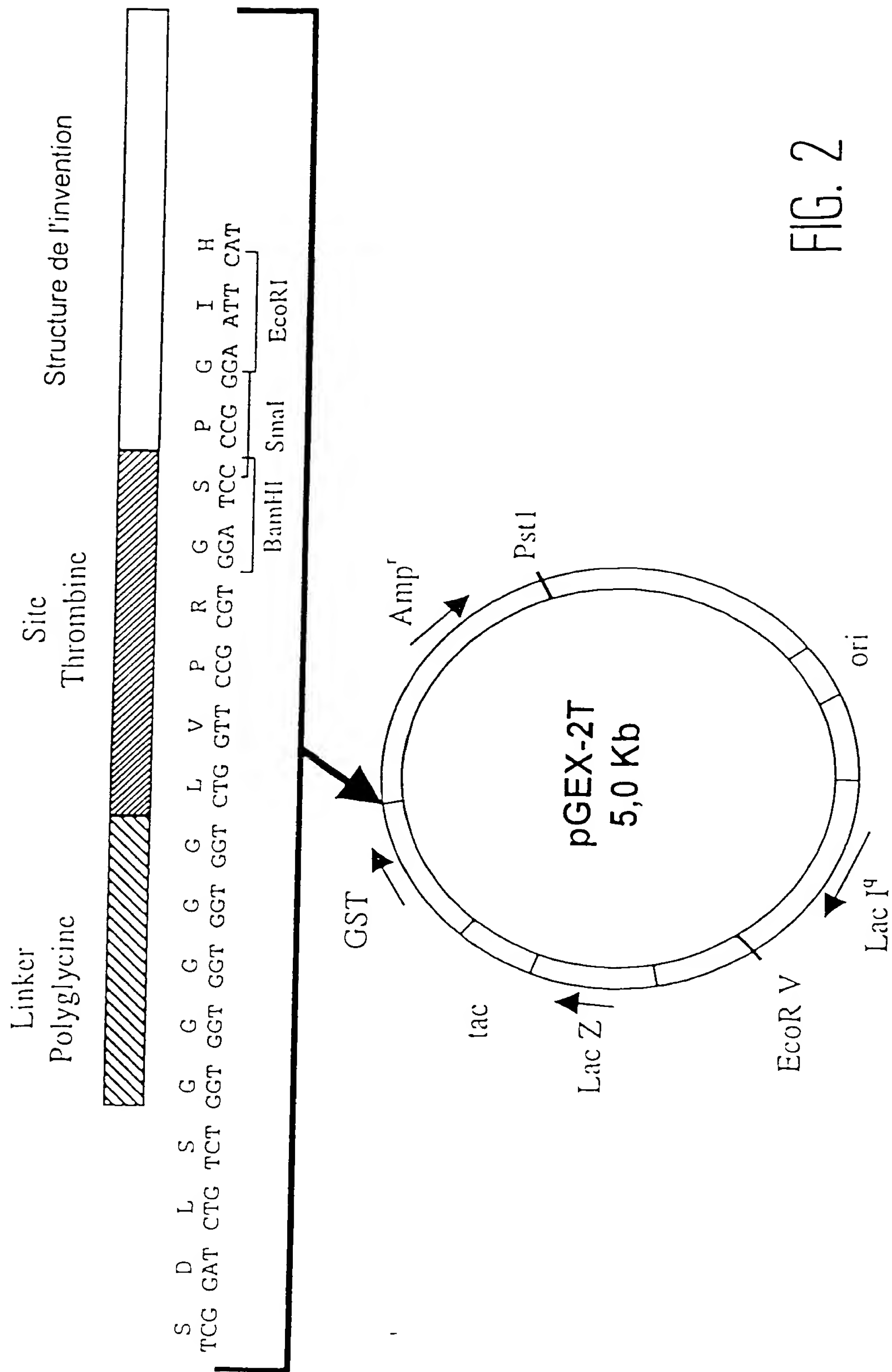


FIG. 2

3 / 9

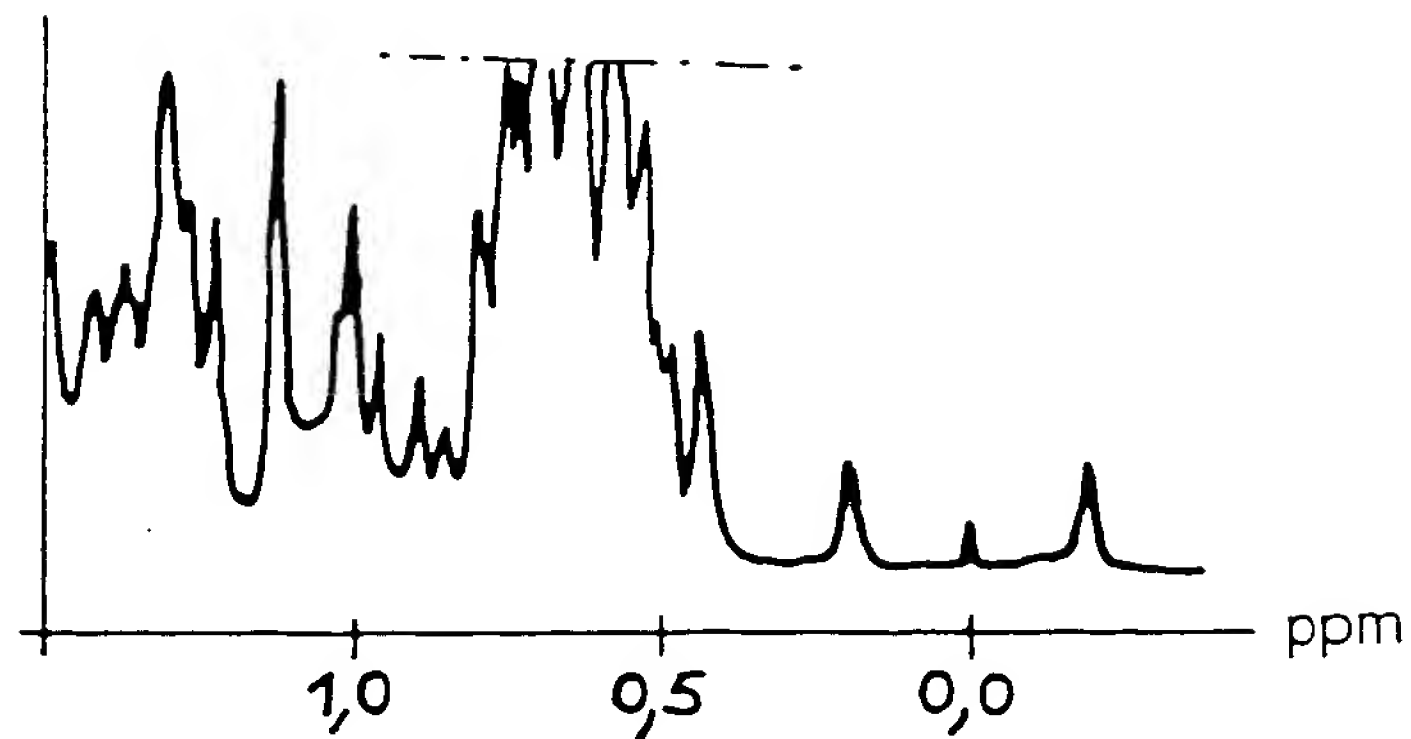


FIG. 3

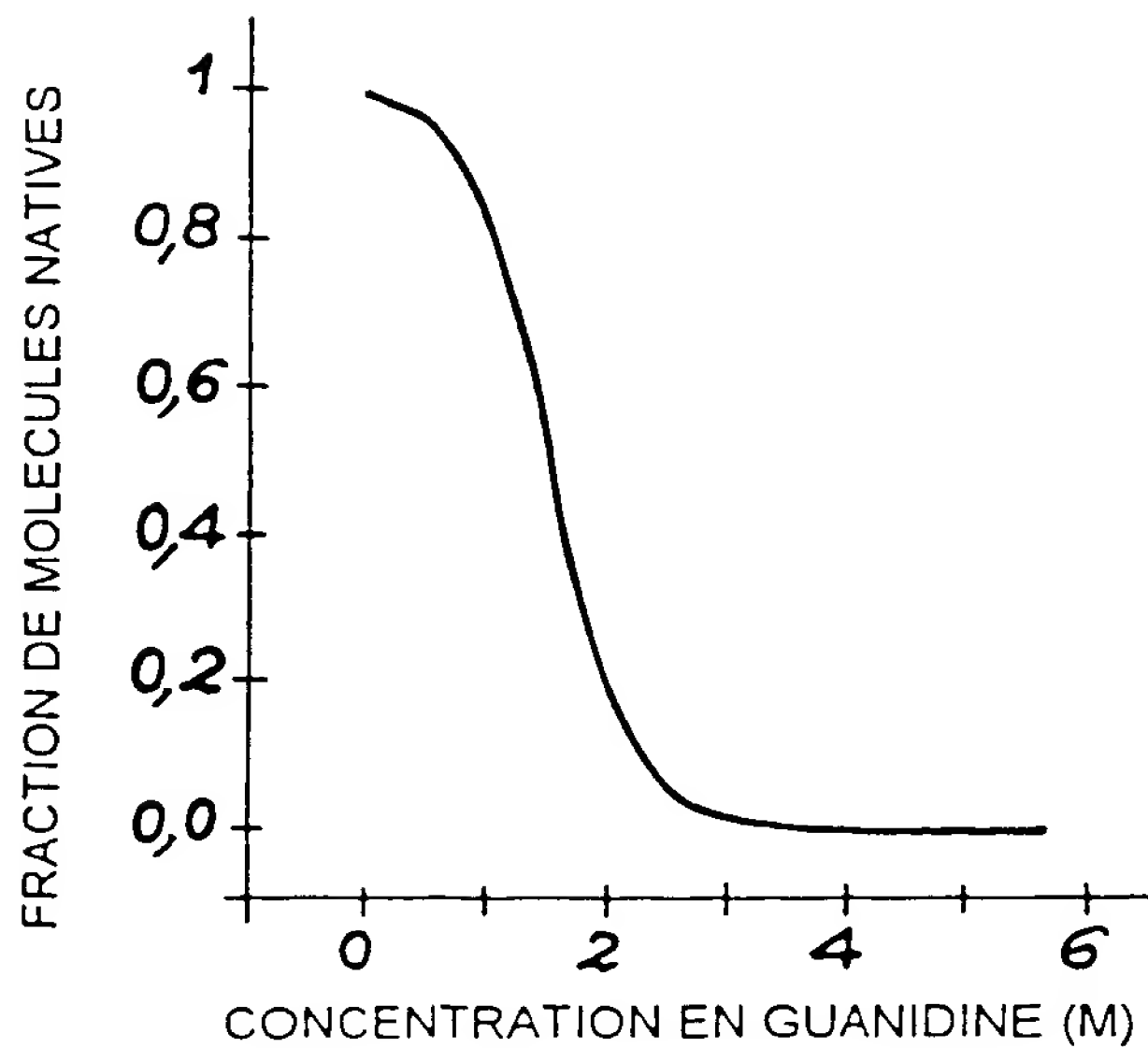


FIG. 4

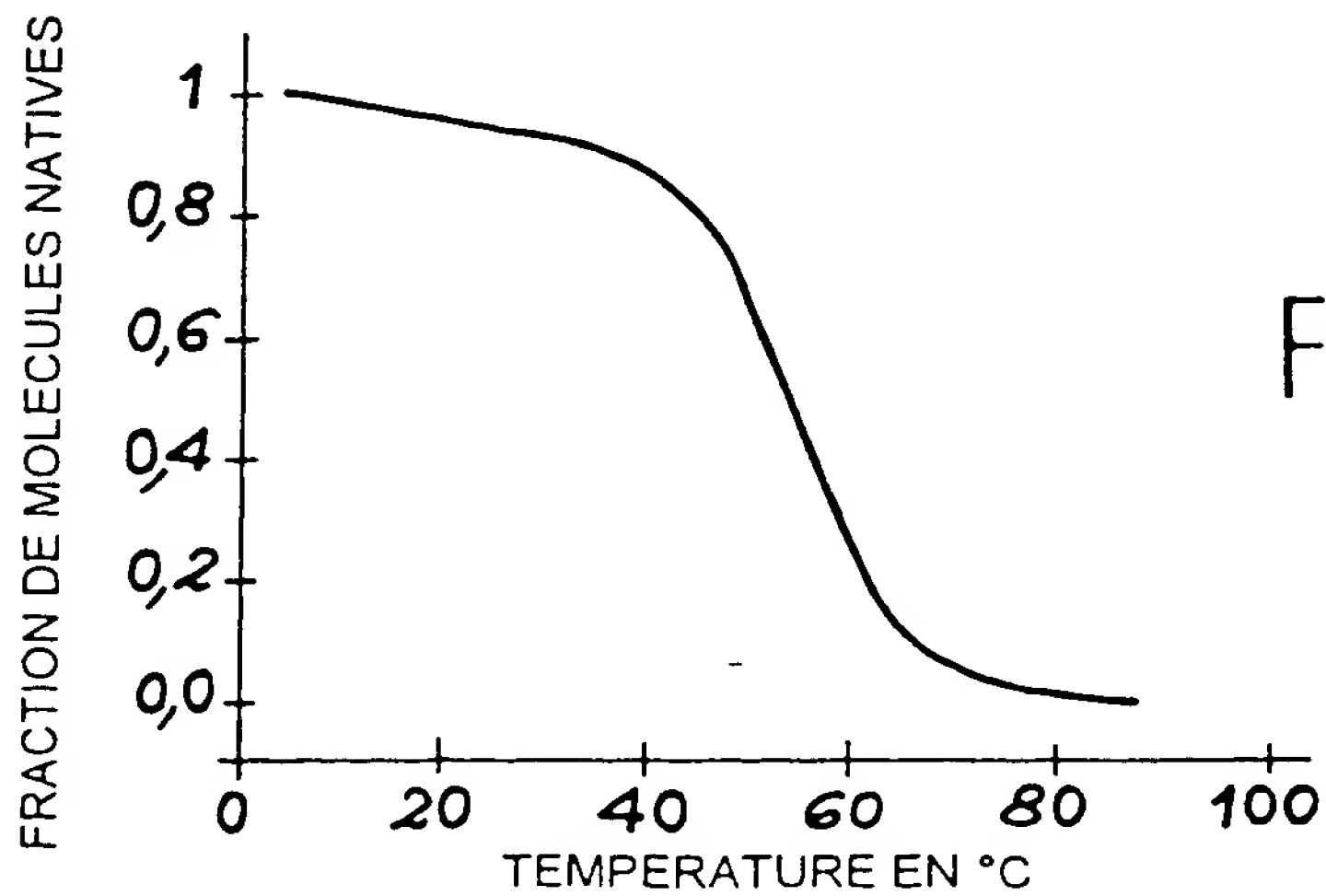


FIG. 5

Domaine 2

Met	Ala	Met	Val	Ser	Glu	Phe	Leu	Lys	Gln	Ala	Trp	Phe	Ile	1	5	10
Glu	Asn	Glu	Glu	Gln	Glu	Tyr	Val	Gln	Thr	Val	Lys	Ser	Ser	15	20	25
Lys	Gly	Gly	Pro	Gly	Ser	Ala	Val	Ser	Pro	Tyr	Pro	Thr	Phe	30	35	40
Asn	Pro	Ser	Ser	Asp	Val	Ala	Ala	Leu	His	Lys	Ala	Ile	Met	45	50	55
Val	Lys	Gly	Val	Asp	Glu	Ala	Thr	Ile	Ile	Asp	Ile	Leu	Thr	60	65	70
Lys	Arg	Asn	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Gln	Ile	Lys	Ala	Ala	Tyr	75	80	
Leu	Gln	Glu	Thr	Gly	Lys	Pro	Leu	Asp	Glu	Thr	Leu	Lys	Lys	85	90	95
Ala	Leu	Thr	Gly	His	Leu	Glu	Glu	Val	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	100	105	110
Lys	Thr	Pro	Ala	Gln	Phe	Asp	Ala	Asp	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala	115	120	125
Met	Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Thr	Leu	Ile	Glu	Ile	130	135	140
Leu	Ala	Ser	Arg	Thr	Asn	Lys	Glu	Ile	Arg	Asp	Ile	Asn	Arg	145	150	
Val	Tyr	Arg	Glu	Glu	Leu	Lys	Arg	Asp	Leu	Ala	Lys	Asp	Ile	155	160	165
Thr	Ser	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Phe	Arg	Asn	Ala	Leu	Leu	Ser	170	175	180
Leu	Ala	Lys	Gly	Asp	Arg	Ser	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Asn	Glu	185	190	200
Asp	Leu	Ala	Asp	Ser	Asp	Ala	Arg	Ala	Leu	Tyr	Glu	Ala	Gly	205	210	215
Glu	Arg	Arg	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Asn	Val	Phe	Asn	Thr	Ile	220	225	
Leu	Thr	Thr	Arg	Ser	Tyr	Pro	Gln	Leu	Arg	Arg	Val	Phe	Gln	230	235	240
Lys	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Ser	Lys	His	Asp	Met	Asn	Lys	Val	Leu	245	250	260
Asp	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Asp	Ile	Glu	Lys	Cys	Leu	Thr	Ala	265	270	275
Ile	Val	Lys	Cys	Ala	Thr	Ser	Lys	Pro	Ala	Phe	Phe	Ala	Glu	280	285	290
Lys	Leu	His	Gln	Ala	Met	Lys	Gly	Val	Gly	Thr	Arg	His	Lys	295	300	
Ala	Leu	Ile	Arg	Ile	Met	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp	Met	305	310	315
Asn	Asp	Ile	Lys	Ala	Phe	Tyr	Gln	Lys	Met	Tyr	Gly	Ile	Ser	320	325	330
Leu	Cys	Gln	Ala	Ile	Leu	Asp	Glu	Thr	Lys	Gly	Asp	Tyr	Glu	335	340	345
Lys	Ile	Leu	Val	Ala	Leu	Cys	Gly	Gly	Asn					350	355	

FIG. 6A: Annexine I humaine

Séquence ID n°2

5/9

Domaine 1

Met	Ala	Gln	Val	Leu	Arg	Gly	Thr	Val	Thr	Asp	Phe	Pro	Gly
1				5						10			
Phe	Asp	Glu	Arg	Ala	Asp	Ala	Glu	Thr	Leu	Arg	Lys	Ala	Met
15					20					25			
Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Ser	Ile	Leu	Thr	Leu	Leu
	30					35					40		
Thr	Ser	Arg	Ser	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Glu	Ile	Ser	Ala	Ala
		45					50					55	
Phe	Lys	Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp	Asp	Leu	Lys
			60					65					70
Ser	Glu	Leu	Thr	Gly	Lys	Phe	Glu	Lys	Leu	Ile	Val	Ala	Leu
				75					75				
Met	Lys	Pro	Ser	Arg	Leu	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Glu	Leu	Lys	His
80					85					90			
Ala	Leu	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Thr	Glu
	95					100					105		
Ile	Ile	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Ile	Lys
		110					115					120	
Gln	Val	Tyr	Glu	Glu	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp
			125					130				135	
Val	Val	Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Met	Leu	Val
				140					145				
Val	Leu	Leu	Gln	Ala	Asn	Arg	Asp	Pro	Asp	Ala	Gly	Ile	Asp
150					155					160			
Glu	Ala	Gln	Val	Glu	Gln	Asp	Ala	Gln	Ala	Leu	Phe	Gln	Ala
	165					170					175		
Gly	Glu	Leu	Lys	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Lys	Phe	Ile	Thr
		180					185					190	
Ile	Phe	Gly	Thr	Arg	Ser	Val	Ser	His	Leu	Arg	Lys	Val	Phe
			195					200				205	
Asp	Lys	Tyr	Met	Thr	Ile	Ser	Gly	Phe	Gln	Ile	Glu	Glu	Thr
			205					210					
Ile	Asp	Arg	Glu	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Leu
215					220					230			
Ala	Val	Val	Lys	Ser	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Ala	Tyr	Leu	Ala
	235					240					245		
Glu	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Asp
		250					255					260	
His	Thr	Leu	Ile	Arg	Val	Met	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp
			265					270				275	
Leu	Phe	Asn	Ile	Arg	Lys	Glu	Phe	Arg	Lys	Asn	Phe	Ala	Thr
			280					285					
Ser	Leu	Tyr	Ser	Met	Ile	Lys	Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Tyr
290					295					300			
Lys	Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Glu	Asp	Asp		
	305					310					315		

FIG. 6 B : Annexine V humaine

Domaine 2

Met	Ala	Ser	Ile	Trp	Val	Gly	His	Arg	Gly	Thr	Val	Arg	Asp	1	5	10
Tyr	Pro	Asp	Phe	Ser	Pro	Ser	Val	Asp	Ala	Glu	Ala	Ile	Gln	15	20	25
Lys	Ala	Ile	Arg	Gly	Ile	Gly	Thr	Asp	Glu	Lys	Met	Leu	Ile	30	35	40
Ser	Ile	Leu	Thr	Glu	Arg	Ser	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Leu	Ile	45	50	55
Val	Lys	Glu	Tyr	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly	Lys	Glu	Leu	Lys	Asp	60	65	70
Asp	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu	Ser	Gly	His	Phe	Glu	His	Leu	Met	75	80	
Val	Ala	Leu	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Gln	85	90	95
Leu	Lys	Lys	Ser	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Glu	Asp	Ala	100	105	110
Leu	Ile	Glu	Ile	Leu	Thr	Thr	Arg	Thr	Ser	Arg	Gln	Met	Lys	115	120	125
Asp	Ile	Ser	Gln	Ala	Tyr	Tyr	Thr	Val	Tyr	Lys	Lys	Ser	Leu	130	135	140
Gly	Asp	Asp	Ile	Ser	Ser	Glu	Thr	Ser	Gly	Asp	Phe	Arg	Lys	145	150	
Ala	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Asp	Glu	Ser	Leu	155	160	165
Lys	Val	Asp	Glu	His	Leu	Ala	Lys	Gln	Asp	Ala	Gln	Ile	Leu	170	175	180
Tyr	Lys	Ala	Gly	Glu	Asn	Arg	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Lys	185	190	195
Phe	Thr	Glu	Ile	Leu	Cys	Leu	Arg	Ser	Phe	Pro	Gln	Leu	Lys	200	205	210
Leu	Thr	Phe	Asp	Glu	Tyr	Arg	Asn	Ile	Ser	Gln	Lys	Asp	Ile	215	220	
Val	Asp	Ser	Ile	Lys	Gly	Glu	Leu	Ser	Gly	His	Phe	Glu	Asp	225	230	235
Leu	Leu	Leu	Ala	Ile	Val	Asn	Cys	Val	Arg	Asn	Thr	Pro	Ala	240	245	250
Phe	Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	His	Arg	Ala	Leu	Lys	Gly	Ile	Gly	255	260	270
Thr	Asp	Glu	Phe	Thr	Leu	Asn	Arg	Ile	Met	Val	Ser	Arg	Ser	275	280	285
Glu	Ile	Asp	Leu	Leu	Asp	Ile	Arg	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	His	290	295	
Tyr	Gly	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Asp	Thr	Ser	300	305	310
Gly	Asp	Tyr	Glu	Ile	Thr	Leu	Leu	Lys	Ile	Cys	Gly	Gly	Asp	315	320	325

FIG. 6C : Annexine III humaine

Séquence ID n°4

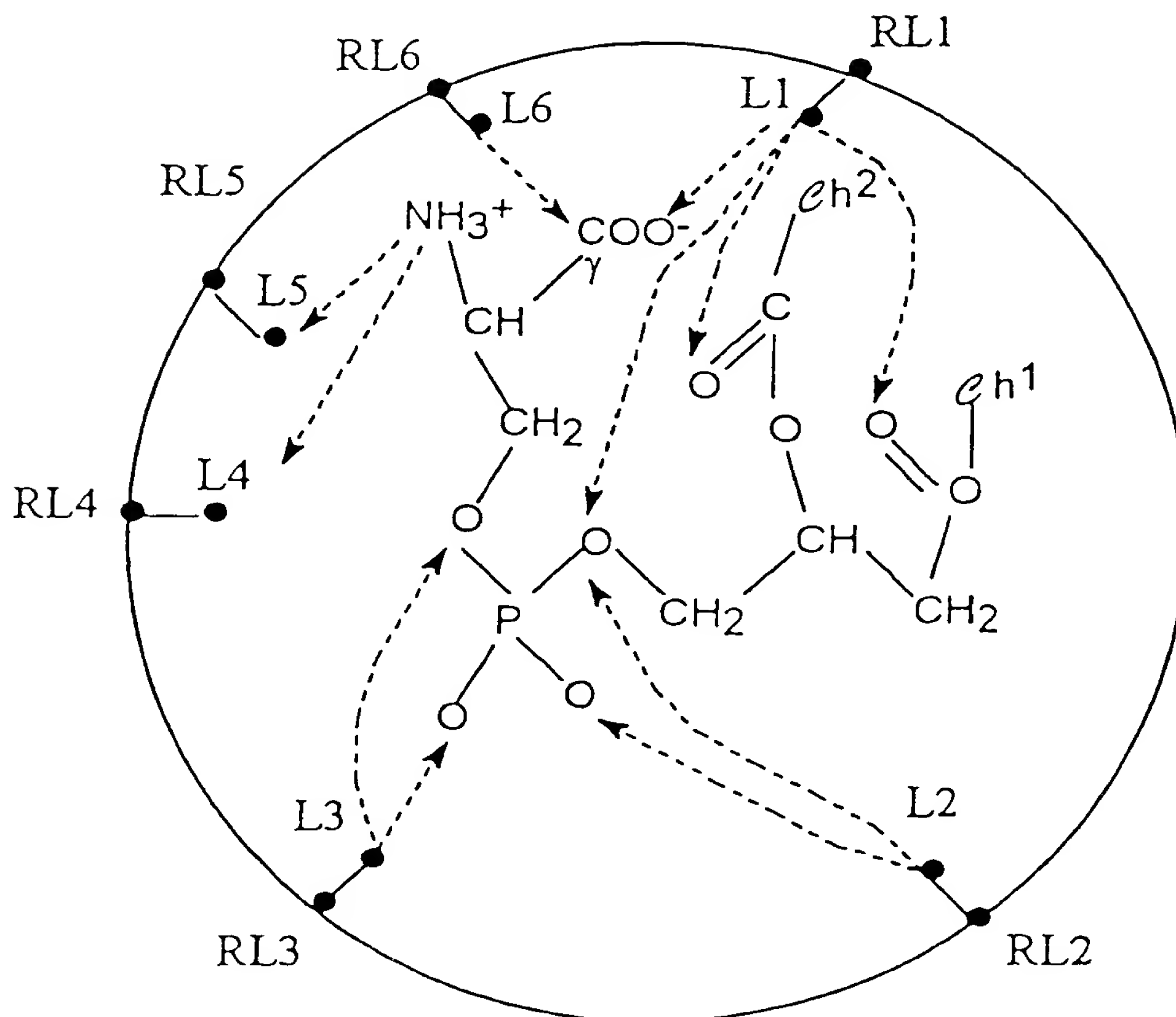
7 / 9

Domaine 1	Met	Ala	Thr	Lys	Gly	Gly	Thr	Val	Lys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
	1				5					10				
	Asn	Ala	Met	Glu	Asp	Ala	Gln	Thr	Leu	Arg	Lys	Ala	Met	Lys
	15				20					25				
	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Ala	Ile	Ile	Ser	Val	Leu	Ala
	30				35					40				
	Tyr	Arg	Asn	Thr	Ala	Gln	Arg	Gln	Glu	Ile	Arg	Thr	Ala	Tyr
	45				50					55				
	Lys	Ser	Thr	Ile	Gly	Arg	Asp	Leu	Ile	Asp	Asp	Leu	Lys	Ser
	60				65					70				
	Glu	Leu	Ser	Gly	Asn	Phe	Glu	Gln	Val	Ile	Val	Gly	Met	Met
					75					80				
	Thr													
	85													

Séquence ID n°5

Domaine 2	Pro	Thr	Val	Leu	Tyr	Asp	Val	Gln	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	
	86					90					95			
	Ala	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Glu	Gly	Cys	Leu	Ile	Glu
	100					105					110			
	Ile	Leu	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Ile	Asn
	115					120					125			
	Gln	Thr	Tyr	Gln	Leu	Gln	Tyr	Gly	Arg	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp
	130					135					140			
	Ile	Arg	Ser	Asp	Thr	Ser	Phe	Met	Phe	Gln	Arg	Val	Leu	Val
	145					150								
	Ser	Leu	Ser	Ala	Gly	Gly	Arg	Asp	Glu	Gly	Asn	Tyr	Leu	Asp
	155				160						170			
	Asp	Ala	Leu	Val	Arg	Gln	Asp	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Glu	Ala
	175				180						185			
	Gly	Glu	Lys	Lys	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Val	Lys	Phe	Leu	Thr
	190				195						200			
	Val	Leu	Cys	Ser	Arg	Asn	Arg	Asn	His	Leu	Leu	His	Val	Phe
	205				210						215			
	Asp	Glu	Tyr	Lys	Arg	Ile	Ser	Gln	Lys	Asp	Ile	Glu	Gln	Ser
	220				225									
	Ile	Lys	Ser	Glu	Thr	Ser	Gly	Ser	Phe	Glu	Asp	Ala	Leu	Leu
	230				235						240			
	Ala	Ile	Val	Lys	Cys	Met	Arg	Asn	Lys	Ser	Ala	Tyr	Phe	Ala
	245				250						255			
	Glu	Lys	Leu	Tyr	Lys	Ser	Met	Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Asp
	260				265						270			
	Asn	Thr	Leu	Ile	Arg	Val	Met	Val	Ser	Arg	Ala	Glu	Ile	Asp
	275				280						285			
	Met	Leu	Asp	Ile	Arg	Ala	His	Phe	Lys	Arg	Leu	Tyr	Gly	Lys
	290				295									
	Ser	Leu	Tyr	Ser	Phe	Ile	Lys	Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Tyr
	300				305						310			
	Arg	Lys	Val	Leu	Leu	Val	Leu	Cys	Gly	Gly	Asp	Asp		
	315				320						325			

FIG. 6D: Annexine IV humaine



Composé (I) + phosphatidylsérine

FIG. 7

FIG. 8

